



Les fonctions non-apoptotiques et pro-fibrosantes de la protéine pro-apoptotique BAX dans la fibrose pulmonaire idiopathique

Stéphanie Brayer

► To cite this version:

Stéphanie Brayer. Les fonctions non-apoptotiques et pro-fibrosantes de la protéine pro-apoptotique BAX dans la fibrose pulmonaire idiopathique. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2013. Français. <NNT : 2013PEST0101>. <tel-01137236>

HAL Id: tel-01137236

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01137236>

Submitted on 30 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT

Physiopathologie

Présentée et soutenue par

Stéphanie BRAYER

Le 17 décembre 2013

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris-Est

LES FONCTIONS NON-APOPTOTIQUES ET PRO-FIBROSANTES DE LA PROTEINE PRO- APOPTOTIQUE BAX DANS LA FIBROSE PULMONAIRE IDIOPATHIQUE

Sous la direction du Professeur Bruno CRESTANI

Et sous la co-direction du Docteur Arnaud MAILLEUX

Professeur Sylvain MARCHAND-ADAM

Professeur Dominique ISRAEL-BIET

Professeur Philippe BONNIAUD

Docteur Arnaud MAILLEUX

Professeur Bruno CRESTANI

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les Professeurs Dominique Israel-Biet, Philippe Bonniaud et Sylvain Marchand-Adam d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier le Docteur Marina Pretolani pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, ainsi que pour sa gentillesse et ses conseils avisés. Merci Marina pour m'avoir fait découvrir la cuisine italienne à Noël, et je n'oublie pas la Paella !

Je tiens à remercier le Professeur Bruno Crestani de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ma thèse au sein de son équipe. Merci beaucoup Bruno pour votre soutien, votre encadrement et vos conseils scientifiques.

Je tiens à remercier Madame Nathalie Josso pour son aide financière au cours des trois premières années de ma thèse (Prix Mariane Josso, Fondation pour la Recherche Médicale) ainsi que le Fonds de dotation « Recherche en santé respiratoire » qui a financé ma quatrième année de thèse. Je tiens aussi à remercier l'association CARDIF qui a permis que ce projet se fasse.

Je tiens aussi à remercier les membres de l'équipe 2, Nassima, Corinne, Marlène, Marianne, Fatima, Séverine, Pascale, Julien F, Julien B (ton fantôme Casper te remercie pour tout le réconfort durant ces années !). Rania merci pour tes conseils scientifiques et ton expertise du maniement du FACS, ainsi que pour ton amitié. Merci beaucoup Clémentine pour tes conseils pour la thèse. Je remercie aussi les membres de l'équipe 4, Alexandra, Aude et Ignacio.

Un grand Merci à Corentine, une gestionnaire hors pair, toujours à l'écoute, efficace et tellement indispensable.

Merci Béatrice pour nos discussions, ta bonne humeur et nos fous rires. Merci Diallo Sickou, pour toujours passer me faire un petit coucou et merci encore pour ta bonne humeur et ta gentillesse.

Merci Docteur Keren (Po... non Borensztajn !) pour ton écoute et ta gentillesse. Merci pour tes conseils et ton humour que j'apprécie tellement !

Merci Olivier pour les aprèm Crêpes Nutela/Confiture, toujours à la pointe du goût !

Merci Valérie pour tes conseils que ce soit sur le plan scientifique ou humain.

Je remercie le Docteur Laurent Plantier pour ses conseils avisés et sa vision du monde scientifique, je tiens à remercier aussi le Docteur Monique Dehoux et le Docteur Marcel Bonay.

Merci Audrey, pour les conseils de dernière année de thèse et pour toute l'aide que tu m'as apporté pour les manip malgré, un genou en moins, une maladie de Lyme et une intoxication au CO₂..., tu pourras au moins te vanter que ce qui ne tue pas rend plus fort...

Ma Charlène, il va falloir beaucoup d'années pour que je puisse rembourser ma dette, merci pour toujours me pousser à mieux faire, merci de m'avoir donné du courage et de la confiance, merci d'être tout simplement une amie. Merci aussi de me laisser m'étaler sur ton bureau, c'est provisoire, bien entendu ! (6 mois pas plus !).

Merci Garthiga pour ta gentillesse, ta bonne humeur à toute épreuve, ta générosité et merci aussi pour m'avoir sauvé la vie (plusieurs fois déjà !). Nos nocturnes et les plats Jap que nous avons partagés avec Erika et Rania vont me manquer (surtout le chirashi saumon !). Ne change surtout pas, tu es formidableeeeeeee...

Erika, quatre ans déjà!, presque 1260 jours passés dans le même bureau, à voir le soleil ou la lune !, beaucoup de paquets de mouchoirs utilisés (une pensée particulière pour la boîte à ...), mais aussi heureusement beaucoup de fous rires (j'accuse..., Toop Toop...), c'est passé vite, merci d'avoir partagé avec moi tous ces moments et ceux qui vont suivre... Merci encore Erika pour les opérations musclées de remise en place du dos. N'oublie pas de t'entraîner quand je ne serais plus là, « quand sa pègue, tu jettes la chocolatine dans la poche, que tu mets dans la malle de la voiture ! » Voiture qu'il faudrait que tu conduises au passage!

Merci à tous les membres du bureau étudiant, ceux qui sont partis, ceux qui restent et ceux qui arrivent, Rachel, Elise, Sara Tadbiri, Sara Melbouci, Sarah, Kahina, Sophie LKS (merci pour les nems lol, et laisse le dormir !!), Sophie qui nous a quitté pour le Canada, Akila (merci pour ses 3 années en ta compagnie si agréable), Laura (merci pour ta gentillesse et ton aide précieuse), Elodie, Pauline (merci pour les « recherches approfondies » que tu as faites pour moi ...), Tania, Stéphanie « la petite » et Nicolas ou « TIC et TAC » pour les intimes, Paër, Martine, Marc, Delphine et Aude. Merci Aude M2 (Mon idole) pour m'avoir fait découvrir la cuisine Africaine par livraison, qui n'arrive jamais au site de la Faculté cela dit en passant! Merci à Natacha pour avoir rapporté le soleil de Marseille, et ta bonne humeur tous les jours de la semaine à Saint-Ouen !

Je tiens à remercier aussi tous les membres de l'unité 700 Inserm et tout particulièrement les membres de l'équipe 1 d'épidémiologie, Bibi, Bénédicte, David, Dominique (et ses huiles essentielles et ses jolies plantes, merci pour cette verdure !), Jay, et le Dr Gabriel Thabut.

Une pensée spéciale pour Paul et Martine qui sont partis profiter des joies de la retraite.

Un grand Merci à Joëlle qui m'a accueilli dans le laboratoire à mon arrivée dans l'unité 700. Merci Joëlle d'avoir pris le temps de me montrer le fonctionnement du laboratoire, merci pour ta gentillesse, ta patience et tes références musicales que j'adore ! tu es vraiment une maman poule pour moi et pour beaucoup d'autres j'en suis sûr!

Je tiens aussi à remercier ma famille, ma mère, mon père, ma sœur, ma cousine, Jean-René, Inès et Lilian pour tout le soutien qu'ils m'ont apporté durant ses quatre années loin de la maison et du soleil du midi. Ma tante Marie-josé, ma cousine Cécile, mon cousin Vivien qui m'ont accueillie dans leur foyer Parisien durant ces quatre années. Merci Marie-Jo pour tout ce que tu m'as apporté, pour ton soutien, ton écoute, ton aide, ta générosité, tu es une tatie géniale.

Merci à mes amies d'enfance Maryline, Sandra, Sandrine, Stéphanie, Marjolaine, Anne qui ont supporté mes histoires de laboratoires, merci les filles ! Et Merci infiniment Irène pour l'aide que tu m'as apporté malgré la distance, je t'en dois une !

Merci Docteur Arnaud Mailleux pour ton soutien durant ses quatre années, pour toute l'expérience scientifique que tu m'as permis d'acquérir et aussi Merci Arnaud pour ta patience, tes conseils durant ces quatre années (je pense aussi à tous les paquets de mouchoirs que je te dois !!!). Désolé Arnaud pour tes premiers cheveux blancs !!!

TABLE DES MATIERES

RESUME	7
ABREVIATIONS	8
AVANT-PROPOS.....	10
CHAPITRE I- LES FONCTIONS DE LA PROTEINE BAX DANS L'APOPTOSE	11
I. LA MORT CELLULAIRE PAR APOPTOSE	11
1) <i>Importance et rôle physiologique</i>	<i>11</i>
a) Exemples de rôles au cours du développement embryonnaire	11
b) Rôle dans l'homéostasie tissulaire.....	13
2) <i>Caractéristiques morphologiques</i>	<i>14</i>
3) <i>Évènements majeurs biochimiques</i>	<i>15</i>
a) Voie intrinsèque	16
b) Voie extrinsèque	20
c) Les caspases	26
d) Substrats des caspases.....	29
e) Fragmentation de l'ADN et désactivation de la réparation de l'ADN.....	30
f) Déassemblage de la structure cellulaire.....	30
g) Rôle central de ROCK dans les processus apoptotiques	30
h) Les protéines régulatrices des caspases.....	31
i) Autres protéases impliquées dans l'apoptose.....	35
II. LES FORMES NON-APOPTOTIQUES DE MORT CELLULAIRE	36
III. LES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2	38
1) <i>Généralités sur la structure des protéines de la Famille BCL-2</i>	<i>38</i>
2) <i>Identification et fonctions des membres de la famille BCL-2 dans l'apoptose.....</i>	<i>39</i>
a) Les membres anti-apoptotiques	40
b) Les membres pro-apoptotiques à multidomains	45
c) Les membres pro-apoptotiques BH3 unique.....	47
IV. LA PROTEINE BAX DANS L'APOPTOSE.....	58
1) <i>Découverte et conservation au sein des espèces de Bax</i>	<i>58</i>
2) <i>Structure des différentes isoformes de BAX</i>	<i>58</i>
3) <i>Régulations des fonctions apoptotiques de BAX.....</i>	<i>60</i>
a) Les différents domaines de BAX nécessaire à son adressage à la mitochondrie	61
b) Les différents modèles d'activation de BAX.....	63
c) Oligomérisation de BAX par les protéines BH3-only	68
d) Régulation de l'activation et de l'insertion de BAX	70

e)	Implication de BAX dans d'autres évènements clé de l'apoptose	70
f)	Régulation de l'activité de BAX par des non-membres de la famille BCL-2	71
V.	FONCTIONS NON-APOPTOTIQUES DE BAX ET DES AUTRES MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2	76
1)	<i>Régulation du cycle cellulaire par les protéines de la famille BCL-2</i>	<i>76</i>
2)	<i>Implications des protéines de la famille BCL-2 dans la bioenergetique mitochondriale</i>	<i>78</i>
a)	Métabolisme de le chaîne respiratoire	78
b)	Métabolisme du Calcium	80
c)	Métabolisme du glucose	81
3)	<i>Implications de la protéine BAX dans l'homéostasie du réticulum endoplasmique..</i>	<i>82</i>
a)	La réponse UPR	82
4)	<i>Implications des protéines de la famille BCL-2 dans l'homéostasie tissulaire et cellulaire</i>	<i>82</i>
a)	L'inflammation	82
b)	Autophagie	83
c)	La migration	86
d)	La survie neuronale	87
	CHAPITRE II- LA FIBROSE PULMONAIRE IDIOPATHIQUE	88
I.	INCIDENCE	88
II.	FACTEURS DE RISQUES	88
III.	CARACTERISTIQUES HISTOLOGIQUES	89
IV.	PHYSIOPATHOLOGIE	90
1)	<i>Les myofibroblastes dans les foyers fibroblastiques</i>	<i>91</i>
2)	<i>Atteinte de l'intégrité des cellules épithéliales alvéolaires</i>	<i>92</i>
V.	LES MODELES ANIMAUX DE FIBROSE	92
VI.	HYPOTHESE PHYSIOPATHOLOGIQUE : PERTURBATION DES INTERACTIONS EPITHELIO-MESENCHYMEUSES	94
1)	<i>Réactivation des voies du développement au cours de la fibrogenèse pulmonaire ..</i>	<i>94</i>
a)	Voie sonic hedgehog (SHH)	94
b)	Voie Wnt/ β -caténine	96
c)	Fibroblast Growth Factor (FGF)	97
d)	Hepatocyte Growth factor (HGF)	98
2)	<i>Autres médiateurs impliqués dans la fibrose</i>	<i>99</i>
a)	Les facteurs impliqués dans la régulation de la matrice extracellulaire (MEC)	99
b)	Voie de la sérotonine (5-hydroxytryptamine)	100
c)	MicroARNs non codant	101
VII.	HYPOTHESE PHYSIOPATHOLOGIQUE: PARADOXE DE L'APOPTOSE DANS LA FPI	101

1) <i>Sensibilité accrue à l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires</i>	103
a) Augmentation des marqueurs et des régulateurs de l'apoptose dans la FPI	103
b) Voie de signalisation Fas	105
c) Stress oxydant	106
d) Activité télomérase	107
e) Le stress du réticulum endoplasmique	108
2) <i>Résistance des fibroblastes et myofibroblastes à l'apoptose</i>	109
a) Dérégulation des médiateurs solubles	110
b) Dérégulation des inhibiteurs de l'apoptose	113
c) Dérégulation des voies du développement	114
VIII. CONCLUSION	116
RESULTATS	117
DISCUSSION :	121
1) <i>BAX nucléaire est présent dans les noyaux cellulaires de nombreux tissus embryonnaires, adultes normaux et pathologiques</i>	121
a) BAX nucléaire dans les tissus sains	121
b) BAX nucléaire dans les tissus pathologiques	123
2) <i>Localisation nucléaire de BAX dans les cellules en culture in vitro</i>	124
a) BAX est à proximité de la chromatine : rôle dans la transcription ?	125
b) D'autres membres de la famille BCL-2 sont présents dans le noyau	127
3) <i>Les fonctions non-apoptotiques de BAX : implication dans la fibrogenèse pulmonaire ?</i>	128
a) Rôle de BAX dans la prolifération cellulaire	129
b) Implication de la forme nucléaire de BAX dans le contrôle du cycle cellulaire	132
c) Rôle de BAX dans la différenciation myofibroblastique	133
d) Implication de BAX dans la migration des fibroblastes pulmonaires en réponse au PDGF	134
BIBLIOGRAPHIE	138

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau 1 : Récapitulatifs des phénotypes des souris invalidées pour les membres de la famille BCL-2..	54
Tableau 2 : Résumés des interactions de BAX avec différentes protéines nucléaires.	126
Figure 1 : Mort par apoptose des cellules du mésenchyme dans l'espace interdigital des membres en développement chez la souris.....	12
Figure 2 : Mort des cellules du corps des bourgeons terminaux par apoptose chez la souris femelle pubère à 5 semaines.....	12
Figure 3 : La morphologie des cellules apoptotiques.....	14
Figure 4 : Voie intrinsèque de la mort cellulaire chez l'homme.	19
Figure 5 : Les différentes voies d'activation de la caspase-8.....	20
Figure 6 : Inhibition de la caspase-8 par FLIP.	22
Figure 7 : Le nécrosome un complexe impliqué dans la nécrose induite par TNF.	23
Figure 8 : Les différentes caspases.....	27
Figure 9 : Schémas de l'activation de la pro-caspase.....	28
Figure 10 : Représentation schématique de la structure des huit IAPs humaines.....	32
Figure 11 : Les protéines IAPs inhibent l'apoptose en liant les caspases activées.	34
Figure 12 : La nécrose cellulaire médiée par AIF. Le MNNG (N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine) est un agent anti-cancéreux alkylant.	37
Figure 13: Les membres de la famille des protéines BCL-2.....	38
Figure 14 : Comparaison des phénotypes des souris triple KO <i>Bim Bid Puma</i> et double KO <i>Bax Bak</i> au niveau de l'espace interdigital (A) et de l'ouverture du vagin (B).....	53
Figure 15 : Illustration des isoformes de la protéine humaine BAX.....	59
Figure 16 : Structure primaire (a) et tertiaire (b) de BAX humain.....	62
Figure 17: Modèle de la balance apoptotique.	64
Figure 18 : Les modèles d'activation faisant intervenir les protéines apoptotiques à domaine BH3 unique.	64
Figure 19 : Les modèles d'activation où les protéines apoptotiques à domaine BH3 unique agissent comme des inhibiteurs sélectifs des anti-apoptotiques et/ou des activateurs directs de BAX et BAK.	66
Figure 20: Modèle d'ancrage de BAX à la membrane externe mitochondriale.....	68
Figure 21 : Modèle démontrant l'activation de BAX Δ C21, la dimérisation de BAX (α 2- α 5).	70
Figure 22 : Modèle de la régulation de l'apoptose induite par BAX par Ku70.	74
Figure 23 : Régulation du cycle cellulaire par les protéines de la famille BCL-2.	76
Figure 24 : Rôle métabolique de BCL-xL dans la chaîne respiratoire mitochondriale.....	79
Figure 25: Régulation du calcium par les protéines de la famille BCL-2.....	80
Figure 26 : Les protéines BH3 et les mimétiques agissent sur les interactions Beclin-1-BCL-2.	84

Figure 27: Régulation de l'apoptose et de l'autophagie par les protéines de la famille BCL-2.	85
Figure 28: Modèle du rôle de BAX et BAK dans la régulation de P27.	86
Figure 29: Schémas d'un poumon sain (A) ou atteint de fibrose pulmonaire idiopathique (B).	90
Figure 30: Modèle simplifié de la voie Sonic Hedgehog.	95
Figure 31 : Schéma simplifié des voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose.	102
Figure 32: Immunomarquage pour BAX sur coupes d'embryon humain à 12 semaines de gestation dans (A-B) la bronche, (C-D) l'œsophage, la peau (E-G), le cœur (H) et le muscle strié (I).	122
Figure 33 : Marquages immunohistochimique de BAX dans les tissus humains sains.	122
Figure 34 : Marquage nucléaire de BAX dans les fibroblastes de FPI.	125
Figure 35: Interaction BAX/HP1g dans les fibroblastes témoins et de FPI.	127
Figure 36 : La prolifération et le cycle cellulaire des FPH de FPI est inhibée dans les cellules transfectées avec les ARNi <i>BAX</i> A.	131
Figure 37 : L'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire P21 augmente dans les FPH de FPI transfectées avec les ARNi <i>BAX</i>	131
Figure 38: Augmentation de l'aSMA et du collagène I (COL1) dans les fibroblastes de FPI transfectés avec les ARNi <i>BAX</i> (n=4).	133
Figure 39 : Effets différentiels de l'inhibition de BAX sur la migration des FPH de témoins et de FPI..	135

Nous nous intéressons aux mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie de la fibrose pulmonaire idiopathique. La fibrose pulmonaire est caractérisée par l'accumulation de protéines de la matrice extracellulaire et de fibroblastes dans les espaces aériens distaux. La désorganisation et la destruction alvéolaires qui résultent de la fibrose aboutissent à une altération des propriétés mécaniques du poumon et à une incapacité à réaliser les échanges gazeux responsables d'une insuffisance respiratoire parfois mortelle. Le pronostic de la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est particulièrement mauvais puisque la médiane de survie est de 3 à 5 ans. Il n'existe actuellement aucune thérapeutique efficace dans la fibrose pulmonaire. Ainsi, il est crucial d'explorer de nouvelles hypothèses physiopathologiques dans cette maladie afin d'ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques.

L'apoptose joue un rôle clé dans le développement de nombreux organes et dans l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. Les protéines de la famille BCL-2 sont des éléments essentiels de la machinerie apoptotique. Ces protéines agissent comme des régulateurs anti- ou pro-apoptotiques. Parmi les membres de la famille BCL-2, le facteur pro-apoptotique BAX contrôle la voie mitochondriale de l'apoptose. Des perturbations de l'apoptose ont été mises en cause dans des maladies pulmonaires comme la fibrose pulmonaire idiopathique.

Des études récentes suggèrent fortement que les protéines de la famille BCL-2 sont également impliquées dans d'autres fonctions cellulaires que le contrôle de l'apoptose. De plus, la protéine BAX est aussi localisée dans le noyau de nombreux types cellulaires. Même si le rôle de la fraction cytoplasmique de BAX au cours de l'apoptose est assez bien caractérisé, les fonctions nucléaires de BAX ne sont pas connues.

Ce travail de thèse a pour but de mieux comprendre le rôle de la forme nucléaire de BAX dans différents processus cellulaires fondamentaux impliqués dans la fibrogenèse. Notre étude montre que la protéine BAX est présente dans le noyau à proximité de l'euchromatine dans différentes lignées d'origine pulmonaire in vitro. Ensuite, nous montrons que la forme nucléaire de BAX est impliquée dans la progression du cycle cellulaire et dans le contrôle de l'état de différenciation myofibroblastique en condition basale. Enfin, nous avons détecté la forme nucléaire de BAX dans l'épithélium hyperplasique et les foyers de fibrose dans le poumon de FPI.

Abréviations

A

α -SMA : « Alpha smooth muscle actine »
ADN : Acide désoxyribonucléique
AIF: « Apoptosis inducing factor »
Apaf-1 : « Apoptotic protease-activating factor-1 »
ATP : Adénosine triphosphate

B

BAD : « BCL2 associated agonist of cell Death »
BAK : « Bcl-2 antagonist or killer »
BAX : « Bcl-2 associated X protein »
BCL-2 : « B-cell CLL/lymphoma 2 »
BCL-B : « Bcl-2-like-10 protein »
BCL-w : « B-cell lymphoma W »
BCL-xL : « B-cell lymphoma-extra large »
BFL-1/A1 : BCL2-related protein A1 or BCL-2 related gene in fetal liver »
BH : « BCL-2 homology »
BID : « BH3 interacting domain death agonist »
BIK : « BCL2-interacting killer »
BIM : « BCL-2 interacting mediator of cell death »
BIR: « Baculoviral IAP repeat »
BMF : « BCL2 modifying factor »
BOK : « BCL-2 related ovarian killer »

C

Ca^{2+} : Calcium
CAD: « Caspase-activated deoxyribonuclease »
CARD : « caspase activation and recruitment domains »
C. elegans : Caenorhabditis elegans
c-FLIP : « FLICE-inhibitory protein »
CTGF : « Connective tissue growth factor »

D

dATP : deoxy ATP

DD : « Death Domain »
DED : « Death Effector Domains »
DISC : « Death-inducing signaling complex »

E

EGF : « Epidermal growth factor »
EndoG: Endonucléase G
ERAD : « Endoplasmic reticulum associated dégradation »
ERK : « extracellular signal-regulated kinase »
ET-1 : Endothéline-1

F

FGF : « Fibroblast growth factor »
FPI: « Fibrose pulmonaire idiopathique »

G

GM-CSF : « Granulocyte macrophage colony stimulating factor »
GTP: Guanosine triphosphate

H

HGF: « Hepatocyte Growth Factor »
 H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène
HRK/DP5 : « Harakiri BCL-2 interacting protein/ death protein 5 »

I

IAP : « Inhibitor of Apoptosis »
IBM: IAP-binding motif »
ICAD: « Inhibitor of CAD »
ICE : « Interleukin-1 β Converting Enzyme »
IgG : Immunoglobuline G
ILP2: « IAP-like protein-2 »

J

JAK/STAT : « Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription »
JNK : « c-Jun NH2-terminal kinase »

K

KO: « Knockout »

L

LDL: « Low density lipoprotein »

M

MAPK : « Mitogen-activating protein kinase »
MCL-1 : « Myeloid cell leukemia sequence 1 »
MDM2 : « Mouse double minute 2 homolog »
MEC : Matrice extracellulaire
MEFs : « mouse embryonic fibroblasts »
ML-IAP: « Melanoma-IAP »
MOMP : « Mitochondrial outer membrane permeabilization »

N

NAIP: « Neuronal apoptosis-inhibitor protein »
NAPDH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NFκB : « Nuclear factor-kappa B »
NGF : « Nerve growth factor »
NK : « Natural killer »
NO : Oxyde nitrique
NOXA : « phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 »
NSCLC : « Non-small-cell lung carcinoma »

O

Omi/HtrA2 : « Omi stress-regulated endoprotease/High temperature requirement protein A2 »

P

PARP: « Poly(ADP-ribose) polymerase »
PDGF : « Platelet derived growth factor »
PMA : « Phorbol-12-myristate-13-acetate »
PUMA : « p53-upregulated modulator of apoptosis »

R

RE : réticulum endoplasmique
RING: « Really Interesting New Gene »

ROCK: « Rho-associated protein kinase »

ROS : espèces réactives d'oxygène

S

SHH: « Sonic hedgehog »
Smac/DIABLO : « Second mitochondria-derived activator of caspase/ direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding protein »
SNC : Système nerveux central
SNP : Système nerveux périphérique

T

TGF-β1 : « Transforming growth factor- beta 1 »
TLR : « Toll-like receptors »
TM: Transmembranaire
TNFα: « tumor necrosis factor alpha »
TNFR: « tumor necrosis factor receptor »
TRAF : « TNFR-associated factor »
TRAIL : « TNF-related apoptosis inducing ligand »

U

UBA: « Ubiquitin-associated »
UPR : « Unfolded protein response »

V

VEGF : « Vascular endothelial growth factor »

X

XIAP: « X-linked IAP »

Avant-propos

La protéine BAX fait partie des protéines de la famille BCL-2. Cette famille de protéine qui comporte au moins 19 membres joue un rôle majeur dans un processus de mort cellulaire contrôlé appelé apoptose. Ainsi dans le premier chapitre du présent manuscrit, nous définirons de façon générale le processus de mort cellulaire par apoptose où BAX joue un rôle central. Mais les protéines de la famille BCL-2 semblent aussi impliquées dans des fonctions non-apoptotiques nécessaires à la vie de la cellule. Nous consacrerons la deuxième partie du premier chapitre à cet aspect nouveau et mal connu des protéines de la machinerie apoptotique en général et de BAX en particulier.

Le versant physiopathologique de la thèse sera abordé au cours du second chapitre où nous introduirons le rôle de BAX et des protéines de la machinerie apoptotique en général dans la fibrose pulmonaire idiopathique.

CHAPITRE I- LES FONCTIONS DE LA PROTEINE BAX DANS L'APOPTOSE

Au moment de sa découverte en 1993, la protéine BAX fut impliquée en premier dans la mort cellulaire par apoptose, le sujet du présent sous-chapitre (Oltvai et al., 1993), (Korsmeyer et al., 1993).

I. LA MORT CELLULAIRE PAR APOPTOSE

L'apoptose a été introduit pour la première fois dans un article par Kerr, Wyllie et Currie en 1972 pour décrire une forme de mort cellulaire distincte de la nécrose, bien que certains aspects de l'apoptose avaient été déjà décrites plusieurs années auparavant (Kerr et al., 1972), (Kerr, 2002).

1) Importance et rôle physiologique

Dans les organismes multicellulaires le nombre de cellules est finement régulé grâce à un équilibre entre les phénomènes de prolifération et de mort cellulaire. L'apoptose de la cellule est un processus physiologique génétiquement programmé par lequel les cellules surnuméraires, dysfonctionnelles et dangereuses pour l'organisme sont éliminées.

a) Exemples de rôles au cours du développement embryonnaire

Cette fonction de mort cellulaire programmée est essentielle au cours du développement embryonnaire. L'apoptose permet de contrôler le nombre de cellules dans une structure donnée. Chez les mammifères, l'apoptose des neurones au cours du développement du système nerveux sympathique est un exemple typique où l'apoptose contribue à l'établissement d'un système nerveux parfaitement organisé et fonctionnel. Au cours du développement du système nerveux périphérique (SNP), une grande quantité de neurones sont produits dont la moitié seront éliminés par apoptose. Pour survivre, les neurones en développement doivent atteindre et innervier leurs cellules cibles appropriées, qui vont fournir les facteurs neurotrophiques nécessaires à la survie

des neurones mais en quantité limitée. Les neurones qui n'auront pas reçu ces signaux des facteurs de croissance mourront par apoptose (Levi-Montalcini, 1987) (Buss et al., 2006).

L'apoptose permet aussi de sculpter les formes de structures anatomiques et d'organes au cours de la morphogenèse embryonnaire. La mort cellulaire par apoptose du mésenchyme dans l'espace interdigital des membres en développement va ainsi contribuer à la séparation des doigts (**figure 1**) (Mori et al., 1995). La lumière d'organes ramifiés telles que les glandes mammaires (Mailleux et al., 2007) (**figure 2**) et salivaires (Tucker, 2007) va se créer par apoptose des cellules situées au centre des cordons épithéliaux initialement pleins.

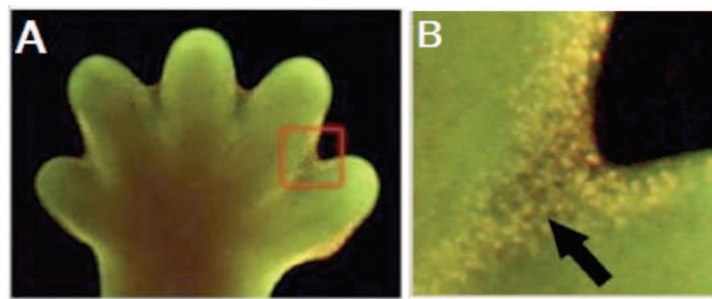


Figure 1 : Mort par apoptose des cellules du mésenchyme dans l'espace interdigital des membres en développement chez la souris.

A. Marquage acridine orange (en jaune) sur les membres postérieurs d'embryon de souris à E15.5 **B.** Agrandissement de la région sélectionnée en **A.** : Marquage des cellules apoptotiques dans le mésenchyme interdigital par l'acridine orange (flèche). *D'après (Bandyopadhyay et al., 2006).*

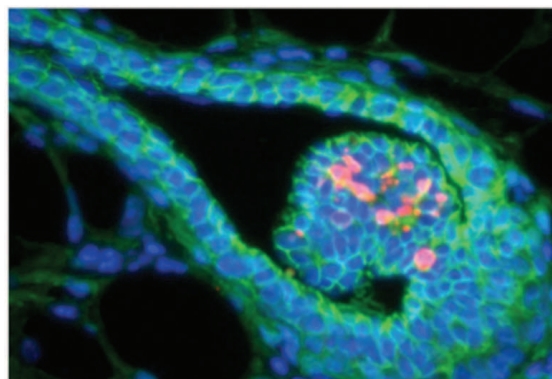


Figure 2 : Mort des cellules du corps des bourgeons terminaux par apoptose chez la souris femelle pubère à 5 semaines.

Les cellules apoptotiques sont marquées pour la caspase-3 clivée en rouge. Les cellules épithéliales sont marquées par la β -caténine en vert et les noyaux en bleu par le DAPI. *D'après (Mailleux et al., 2007).*

De la même manière, des structures embryonnaires entières peuvent être éliminées par apoptose. Initialement, les voies génitales sont représentées par deux systèmes de canaux pairs: canaux de Wolff et de Müller. Lors de la différenciation sexuelle de l'embryon, les canaux Wolff (qui vont former l'épididyme et les canaux déférents chez les mâles) sont éliminés chez les embryons femelles. Chez les embryons mâles, les canaux Müller seront supprimés et conservés chez les femelles pour former les trompes utérines, l'utérus et la partie supérieure du vagin (Pugach, 1975).

b) Rôle dans l'homéostasie tissulaire

L'apoptose est aussi essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire de l'organisme à l'âge adulte. On peut citer par exemple, l'élimination des thymocytes autoréactifs au cours du développement des lymphocytes T dans le thymus par un processus appelé « sélection négative ». Au cours de la sélection négative, les lymphocytes T immatures qui montrent une autoréactivité au contact d'antigènes du soi vont être éliminés par apoptose (Murphy et al., 1990).

La délétion de cellules par apoptose joue aussi un rôle essentiel dans le maintien du bon fonctionnement de certains organes à l'âge adulte. Par exemple, chez les mammifères, certains tissus comme l'intestin ont besoin d'un renouvellement constant afin d'assurer leur rôle de barrière contre les pathogènes. Cet équilibre entre prolifération et apoptose des cellules intestinales permet à l'intestin d'assurer son bon fonctionnement (Hall et al., 1994).

De plus, la délétion par apoptose de cellules devenues inutiles pour l'organisme est aussi essentielle à l'âge adulte. Par exemple, après la période d'allaitement, les glandes mammaires qui avaient pris un volume adapté à la production de lait vont retourner à la normale. Cette diminution de volume s'accompagne d'une diminution importante du nombre de cellules épithéliales par apoptose au cours de la phase d'involution de la glande (Helminen and Ericsson, 1968), (Motyl et al., 2006).

2) Caractéristiques morphologiques

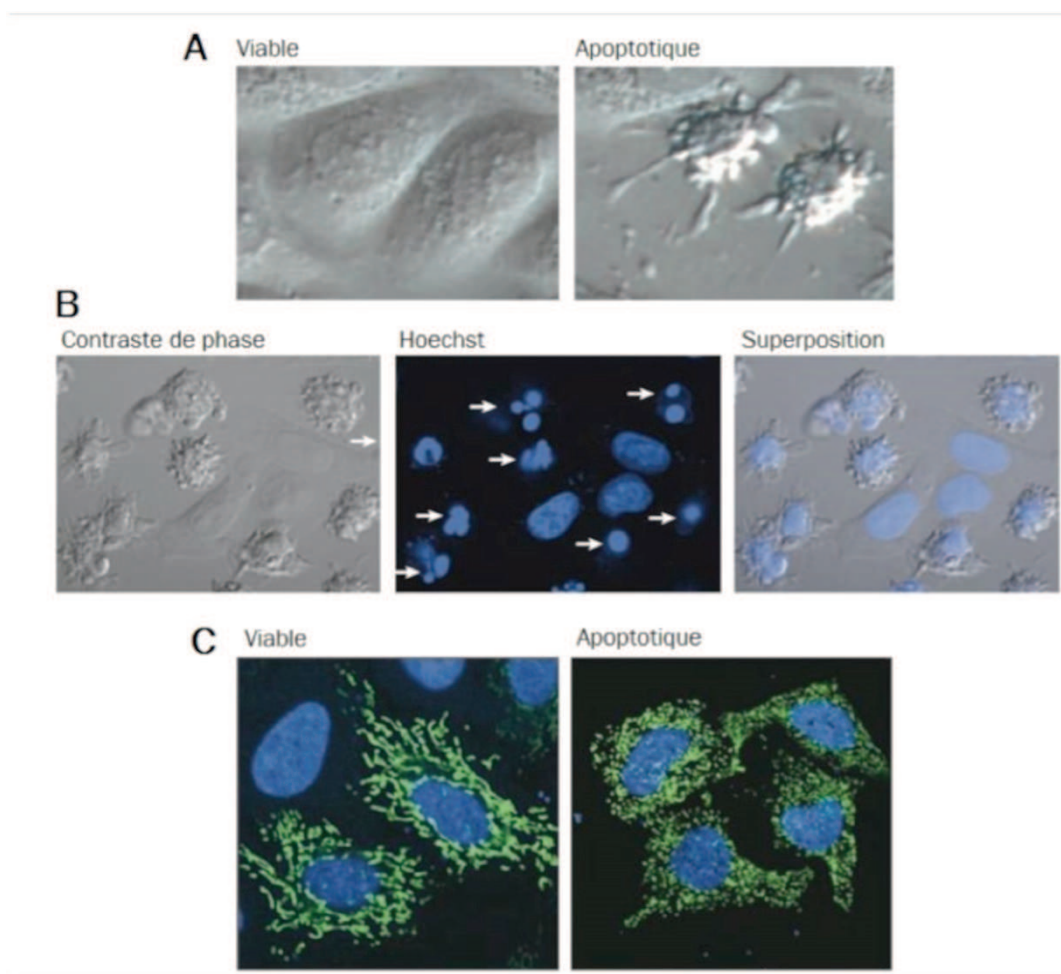


Figure 3 : La morphologie des cellules apoptotiques.

La mort des cellules HeLa est induite par exposition à la daunorubicine (10 M) pendant 12 heures **A**. Le panneau de gauche montre des cellules après 2 h d'exposition, lorsque les deux cellules dans le champ de vision apparaissent toujours en bonne santé. De 4.5 h (à droite), les deux cellules affichent une morphologie apoptotique typique, avec rétraction des cellules et bourgeonnement de la membrane plasmique dynamique **B**. Caractéristiques de condensation nucléaire et de fragmentation associées à l'apoptose. L'apoptose des cellules HeLa est induite par exposition à la l'actinomycine D (5 M) suivie d'une coloration des noyaux (bleu) avec le colorant Hoechst. A titre de comparaison, un mélange de cellules viables et apoptotiques est affiché. Les cellules apoptotiques (flèches) présentent un vaste bourgeonnement de la membrane plasmique et contiennent des noyaux qui sont condensés et/ou fragmentés en plusieurs morceaux **C**. Fragmentation des réseaux mitochondriaux. Pour visualiser les mitochondries, les cellules ont été transfectées avec une construction de la protéine fluorescente verte ciblant la mitochondrie et ensuite, soit elles ne sont pas traitées (à gauche) ou traitées avec 5 M d'actinomycine D pendant 12 h pour induire l'apoptose (panneau de droite). Notez que le réseau mitochondrial est largement interconnecté et apparaît filamenteux dans les cellules viables. En revanche, les réseaux mitochondriaux deviennent très fragmentés dans les premiers stades de l'apoptose. *D'après (Taylor et al., 2008).*

Lorsqu'une cellule entre en apoptose, elle subit des changements morphologiques caractéristiques. Les premiers événements morphologiques observables lors de l'apoptose sont le bourgeonnement de la cellule (**figure 3A Panneau de droite**) qui montre une déformation et une perte du contact avec les cellules voisines. Parallèlement à ces modifications externes, la cellule subit des altérations de sa structure interne. Le cytoplasme (**figure 3A**) et la chromatine (**figure 3C**) se condensent, la chromatine compactée va s'agréger sous l'enveloppe nucléaire, l'ADN va se fragmenter (caryolyse) (**figure 3B**). Le noyau va se contracter (processus de pycnose) puis les membranes plasmiques et nucléaires vont s'invaginer aboutissant à la formation des « corps apoptotiques ». Ces « corps apoptotiques » sont des vésicules membranaires contenant le cytoplasme, la chromatine condensée et fragmentée, ainsi que les organites encore préservés de la cellule (Kerr et al., 1972). L'apoptose s'accompagne aussi d'une perte de l'asymétrie des lipides constituant la double couche lipidique de la membrane plasmique. Ainsi, l'exposition à la surface des phospholipides phosphatidylsérine servira de signal de reconnaissance aux cellules phagocytaires. Ces corps apoptotiques vont rapidement être capturés et dégradés principalement par les macrophages et les cellules voisines (Kurosaka et al., 2003). La formation de ces corps apoptotiques et leur phagocytose rapide ne permet pas au contenu cellulaire de se retrouver libéré dans le milieu environnant, minimisant le risque de réaction inflammatoire (deCathelineau and Henson, 2003).

3) Évènements majeurs biochimiques

L'un des événements majeurs biochimiques liés à la mort cellulaire par apoptose est l'activation des caspases dites « apoptotiques ». Les caspases sont des protéases à cystéines qui vont participer directement au démantèlement de la cellule au cours de l'apoptose (**voir paragraphe c) du présent chapitre pour plus de détails**). Les caspases peuvent être régulées à travers deux voies de signalisation menant à l'apoptose : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (Schafer and Kornbluth, 2006). Ces deux voies menant à l'activation des caspases diffèrent par l'origine des stimuli de mort. La voie intrinsèque est initiée par divers stress intracellulaires. Par contre, la voie extrinsèque est initiée par l'activation de récepteurs de mort à la surface cellulaire. L'activation en cascade des caspases va mener au démantèlement puis à la mort de la

cellule. Les protéines de la famille BCL-2 dont fait partie BAX jouent un rôle central dans l'activation de la cascade des caspases (**voir paragraphe suivant pour plus de détails**).

a) Voie intrinsèque

Ainsi, la voie intrinsèque ou mitochondriale de l'apoptose est activée par divers stress intracellulaires comme l'hypoxie, la déprivation en facteur de croissance, un stress du réticulum endoplasmique, la perte d'attachement à la matrice extracellulaire ou un dommage à l'ADN. L'ensemble de ces stress cytotoxiques sont intégrés par la cellule via les différentes protéines pro-apoptotiques dites à « domaine BH3 unique » de la famille BCL-2. Ces protéines vont ainsi moduler l'activité pro-apoptotique de BAX en réponse à ces stimuli (**voir paragraphe IV pour plus de détails**).

(i) Signaux intracellulaires

1) *Voie p53*

L'apoptose est une réponse cellulaire intrinsèque spécifique à des stress environnementaux qui peuvent avoir lieu à travers des voies dépendantes de p53 (Fridman and Lowe, 2003). Le gène TP53 qui code pour la protéine P53 est un des gènes très fréquemment muté et inactivé dans les cancers humains (Soussi and Beroud, 2001).

P53 est un facteur de transcription qui peut être activé par certains stress comme des dommages à l'ADN, une hypoxie, un stress oncogénique, la sénescence cellulaire, la réparation de l'ADN ou encore des dommages oxydatifs. P53 est maintenue à un niveau faible dans la cellule par son interaction avec la protéine MDM2. MDM2 cible et dégrade P53 par ubiquitinylation. Lors d'un stress cellulaire, l'inhibition de P53 par MDM2 est levée entraînant une rapide accumulation du niveau de protéines P53 qui va entraîner la modulation des gènes cibles menant à l'apoptose de la cellule (Lukashchuk and Vousden, 2007). P53 régule directement l'expression de certains facteurs pro-apoptiques de la famille BCL-2. P53 peut se lier sur le promoteur du gène *Bax* et réguler sa transcription (Miyashita and Reed, 1995). P53 peut aussi induire l'expression de

protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 unique de la famille BCL-2 comme PUMA (Nakano and Vousden, 2001), NOXA (Oda et al., 2000) et BIM (Han et al.).

2) *Stress du réticulum endoplasmique*

Le réticulum endoplasmique (RE) est un des plus large organite intracellulaire qui est formé par une membrane qui s'étend à travers le cytoplasme et qui est lié à l'enveloppe nucléaire. Le RE remplit de nombreuses fonctions cellulaires comme par exemple la synthèse des protéines et leur repliement correct. Le RE prend ensuite leur adressage vers l'appareil de Golgi, les lysosomes ou vers la membrane plasmique pour les protéines sécrétées et de surface cellulaire. Le RE joue aussi un rôle central dans le stockage du calcium intracellulaire (Lam and Galione). Le pliage des protéines dans le RE est induit et est sous le contrôle de protéines chaperonnes résidentes du RE comme GRP78 (glucose-regulated protein 78 ou BiP), GRP94 (glucose-regulated protein 94), la calnexine et la calreticuline, qui empêchent l'agrégation des protéines nouvellement synthétisées, les aides à se plier et à s'assembler correctement (Ni and Lee, 2007). Le RE représente une usine de pliage de protéines qui impose un contrôle de qualité finement régulé, assurant que seules les protéines, correctement pliées, assemblées et fonctionnelles soient délivrées au bon compartiment cellulaire. Le stress du RE est défini comme un état cellulaire dans lequel la capacité du pliage du RE est saturée à la suite d'une augmentation de protéines et/ou une perturbation de la capacité de pliage (Berridge, 2002). Le stress du RE cible l'activation d'une voie de signalisation appelée UPR (unfolded protein response). L'activation de cette voie augmente la quantité de membrane du RE, de chaperonnes et de protéines du pliage, puis atténue le taux de traduction et active la dégradation associée au RE (ERAD), afin d'éliminer ou de limiter l'accumulation de protéines mal pliées (Schroder, 2008). Le stress du RE peut être induit par de nombreuses perturbations physiologiques et/ou environnementales dont par exemple une altération de l'homéostasie du calcium, une accumulation de protéines non pliées et s'agrégeant, une ischémie ou encore une infection virale qui peuvent mener à la mort cellulaire. Il a été montré que certains membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2 comme BIM, NOXA et PUMA étaient impliqués dans l'apoptose induite par le stress du RE (Li et al., 2006b).

3) *Anoïkis*

En absence d'attachement à la matrice extracellulaire, les cellules subissent une forme particulière d'apoptose nommée anoïkis. L'activation du programme de mort par anoïkis peut avoir lieu à travers les deux voies de l'apoptose : extrinsèque en ciblant les récepteurs de mort, ou intrinsèque en perturbant la mitochondrie. L'anoïkis mettant en jeu la voie intrinsèque, implique certains membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2 en amont de l'activation de BAX. En effet, BMF et BIM vont être activées suite au détachement de la cellule à la matrice extracellulaire et induire à la mort cellulaire (Puthalakath et al., 2001), (Reginato et al., 2003).

4) Stress oxydant et espèces réactives d'oxygène (ROS)

Il a été mis en évidence que la mitochondrie et le stress oxydant associé jouaient un rôle essentiel dans la mort apoptotique induite par divers agents de stress. Le stress oxydant apparait lors d'un déséquilibre entre les espèces oxydantes et les espèces anti-oxydantes dans la cellule. Les espèces oxydantes peuvent être dérivées de l'oxygène comme l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle, ou dérivées de l'oxygène et de l'azote comme l'oxyde nitrique (NO). Les ROS sont principalement produites au niveau de la mitochondrie par les complexes I et III de la chaîne respiratoire mais peuvent être aussi produite par d'autres organites comme le réticulum endoplasmique. L'altération de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie est une cause majeure du stress oxydant. Les mécanismes qui induisent la production de ROS mitochondriaux et leurs rôles au cours de l'apoptose ne sont pas encore bien compris (Bayir and Kagan, 2008).

(ii) Perméabilisation de la membrane externe mitochondriale : le « MOMP » et formation de l'apoptosome

L'événement majeur de la voie intrinsèque de l'apoptose est la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (« mitochondrial outer membrane permeabilization » en anglais ou MOMP). Cet événement conduit à l'effondrement de la chaîne respiratoire et de la production d'ATP par la mitochondrie. De plus, le relâchement de protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytoplasme va amener à l'activation de la cascade des caspases. La perméabilisation de

la membrane externe de la mitochondrie est sous le contrôle de régulations fines entre les membres anti- et pro-apoptotique de la famille BCL-2 (**voir paragraphe IV du présent chapitre pour plus de détails**). Ainsi, l'activation des protéines pro-apoptotiques BAX/BAK appartenant à la famille Bcl-2 va induire le MOMP entraînant le relâchement dans le cytoplasme de facteurs pro-apoptotique comme le cytochrome C et les antagonistes des protéines inhibitrices des caspases de la famille IAP (« Inhibitors of Apoptosis ») telles que Smac/DIABLO et Omi/Htra2. Les antagonistes des IAP seront décrits dans **le paragraphe h) de ce chapitre**.

La protéine cytosolique Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) joue un rôle central dans la voie intrinsèque de l'apoptose en aval du MOMP (**figure 4**). Ainsi, Apaf-1 existe dans le cytosol sous forme de monomère inactif. Après le relargage du cytochrome C de la mitochondrie vers le cytosol, celui-ci va se lier à Apaf-1 induisant son changement de conformation par hydrolyse du deoxy ATP (dATP). Apaf-1 va s'oligomériser en une structure heptamérique et va recruter et activer la procaspase-9 pour former l'apoptosome (Yuan et al., 2013). L'apoptosome va ainsi activer la cascade protéolytique des caspases qui va entraîner la mort cellulaire. L'activation de la caspase-9 puis de la cascade des caspases.

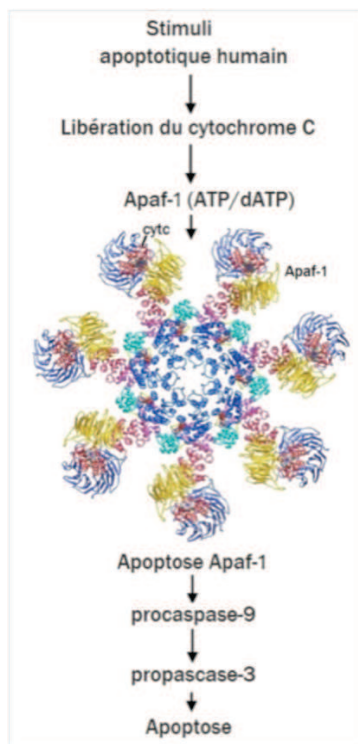


Figure 4 : Voie intrinsèque de la mort cellulaire chez l'homme.

Chez l'homme, au cours de stimuli apoptotiques, la rupture de la membrane mitochondriale va entraîner le relâchement du cytochrome C dans le cytosol où il va interagir avec Apaf-1 et former une structure heptamérique qui va recruter et activer la pro-caspase-9 pour former l'apoptosome qui va à son tour cliver et activer les caspases effectrices comme la caspase-3 induisant ainsi l'apoptose de la cellule. *D'après (Yuan et al., 2013).*

b) Voie extrinsèque

(i) 3.2.1- Structure des récepteurs de mort et leurs signalisations

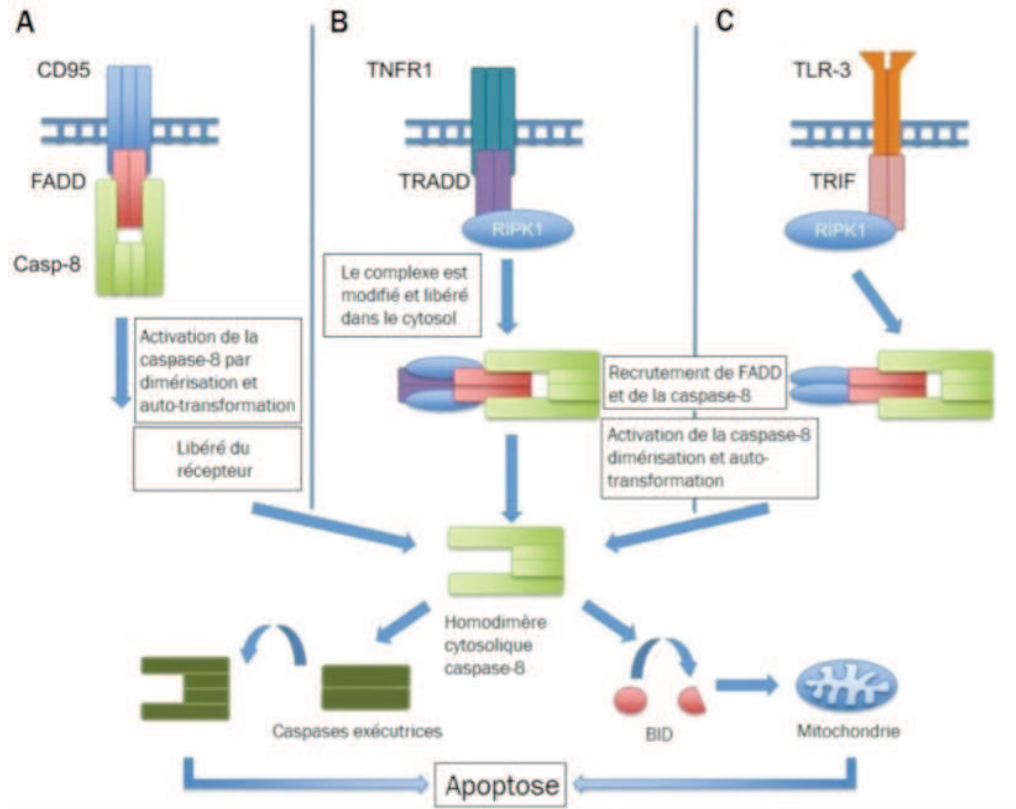


Figure 5 : Les différentes voies d'activation de la caspase-8.

(A) L'engagement du récepteur de mort comme CD95 par son ligand recrute FADD, qui à son tour recrute la caspase-8. La proximité des monomères inactifs de la caspase-8 entraîne leur dimérisation, déclenchent l'activité catalytique et l'autoclivage, qui va stabiliser la caspase-8 dans sa forme active. Lors de la libération dans le cytosol, la caspase-8 peut soit cliver et activer les caspases effectrices ou cliver BID, qui va induire le MOMP. (B) L'activation de la caspase-8 peut aussi se faire à travers la liaison de TNFR1 avec le ligand TNF, qui va recruter TRADD et RIPK1. Avant d'être capable de recruter FADD, et ensuite la caspase-8, ce complexe est modifié par plusieurs ubiquitinations et déubiquitinations, menant à son détachement du récepteur TNFR. (C) Toll-like receptors (TLRs), dont le signal se fait à travers TRIF, nommé TLR3 et TLR4, peut aussi engager la caspase-8. Cela se produit à travers un complexe qui contient TRIF et dépend de RIPK1 et FADD. De plus, le stress génotoxique peut activer la caspase-8 via les complexes RIPK1-FADD. *D'après (Weinlich et al., 2011).*

La voie de signalisation extrinsèque de l'apoptose implique l'interaction de récepteurs de mort transmembranaires avec leur ligand respectif. Ces récepteurs de mort appartiennent à la superfamille des gènes récepteurs de facteurs de nécrose tumorale (TNFRs) (Zhang, 2004). Les membres de cette famille possèdent tous un domaine extracellulaire riche en cystéine et un domaine cytoplasmique d'environ 80 acides

aminés nommés domaines de mort (DD pour Death Domain). Ce domaine de mort joue un rôle essentiel dans la transmission du signal de mort de la surface cellulaire jusqu'à la voie de signalisation intracellulaire.

Il existe trois principaux types de complexes de signalisation pour les récepteurs de mort dans l'apoptose. 1) La signalisation de type Fas qui forme un complexe nommé DISC (death-inducing signaling complex) et qui joue un rôle central dans la transduction du signal apoptotique (**figure 5A**). 2) La signalisation de type TNF qui en fonction des protéines recrutées et du contexte cellulaire peut induire des signaux aussi bien de mort cellulaire (apoptose et nécrose contrôlée) que de survie cellulaire (**figure 5B**) et 3) la signalisation de type TLR (Toll-like receptor) qui induit la mort cellulaire (**figure 5C**).

1) Signalisation de type Fas : mort par apoptose

Cette signalisation implique donc le récepteur membranaire Fas nommé aussi CD95, APO-1, ou DR2. Dans ce modèle, FasL (aussi nommé CD95 ligand) membranaire mène à l'agrégation d'un trimère de Fas pré-assemblé à la membrane plasmique des cellules cibles (**Figure 5A**). Le changement de conformation de Fas induit par cette agrégation va induire le recrutement de molécules adaptatrices et la formation du complexe de signalisation induisant la mort, nommé DISC (Sessler et al., 2013). Le recrutement des molécules adaptatrices FADD se fait par l'interaction des domaines de mort présents à la fois dans la région intracellulaire du récepteur Fas et dans la partie C terminale de FADD. Puis, de manière similaire deux caspases initiatrices comme les caspases-8 (mais aussi la caspase-10 chez la souris) sont recrutées dans le DISC par l'interaction des domaines DED (Death Effector Domains) présents dans la partie N terminale de la caspase-8 et de FADD. Ces deux caspase-8 présentent dans les cellules saines sous forme de pro-enzymes inactives vont lors de leur recrutement dans le DISC subir des changements de conformation par un processus auto-protéolytique et vont former une enzyme active.

La liaison de Fas à son ligand peut mener à deux types de signalisation de mort cellulaire : de type I directe et de type II via la mitochondrie. La signalisation de type I est caractérisée par un niveau élevé de formation de DISC et de quantité de caspase-8 active qui va mener à l'activation directe de la cascade des caspases. La caspase-8 joue

un rôle central dans la voie extrinsèque de l'apoptose. L'activation de la caspase-8 à l'intérieur du complexe DISC peut être inhibée par la protéine c-FLIP (FLICE-inhibitory protein). La protéine c-FLIP est similaire à la caspase-8 mais ne possède pas de site catalytique. c-FLIP et FADD peuvent interagir par leur domaine DED respectif, c-FLIP va donc se comporter comme un inhibiteur compétitif de la caspase-8 pour la formation du complexe avec FADD (**Figure 6**) (Weinlich et al., 2011).

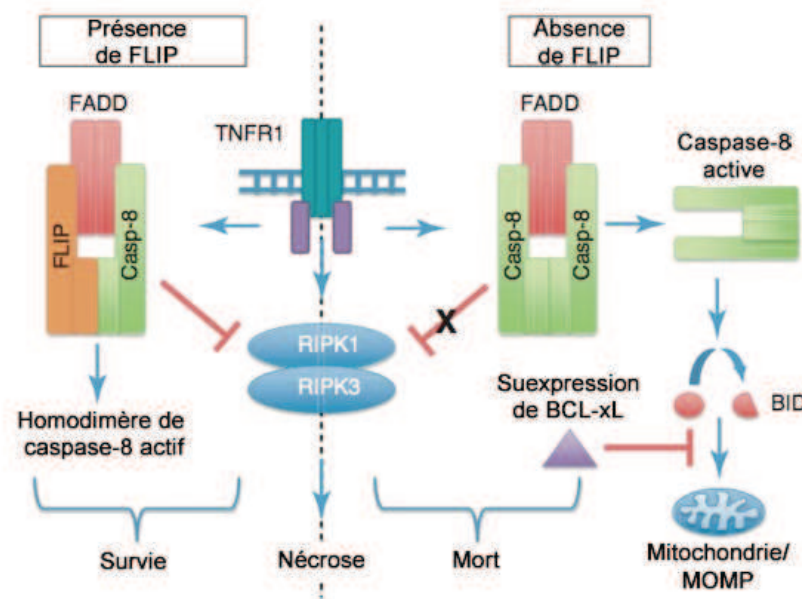


Figure 6 : Inhibition de la caspase-8 par FLIP.

Les cellules sans FLIP échouent à supprimer la nécrose induite par RIPK en réponse au TNF, malgré qu'elles soient capables d'activer les homodimères de la caspase-8 en présence d'une surexpression de BCL-XL, qui bloque l'apoptose. En présence de FLIP, la nécrose est supprimée et l'homodimère de la caspase-8 n'est pas formé efficacement, menant à la survie des cellules. *D'après (Weinlich et al., 2011).*

La signalisation de type II est caractérisée par un niveau faible de formation de DISC et de quantité de caspase-8 active. Dans ce cas, la caspase-8 va cliver et activer la protéine BID (appartenant à la famille BCL-2). La forme tronquée de BID (tBID) fait le pont entre la voie extrinsèque induite par les récepteurs de mort et la voie intrinsèque dite mitochondriale régulée par les protéines de la famille BCL-2. Ceci permettra d'amplifier le signal pro-apoptotique via l'activation de BAX/BAK et la voie mitochondriale / intrinsèque de l'apoptose (**voir paragraphe précédent**).

La liaison du ligand soluble TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) sur son récepteur TRAIL R1/2 nommé TRICK2, KILLER, ou DR5 va induire le même type de réponse apoptotique que le système FAS / FASL.

2) Signalisation de type TNFR1

La signalisation via TNFR1 (tumor necrosis factor receptor, nommé aussi CD120a, p55 et DR1) induisant l'apoptose peut aboutir à la formation de 2 complexes (**figure 7**) (Vandenabeele et al., 2010).

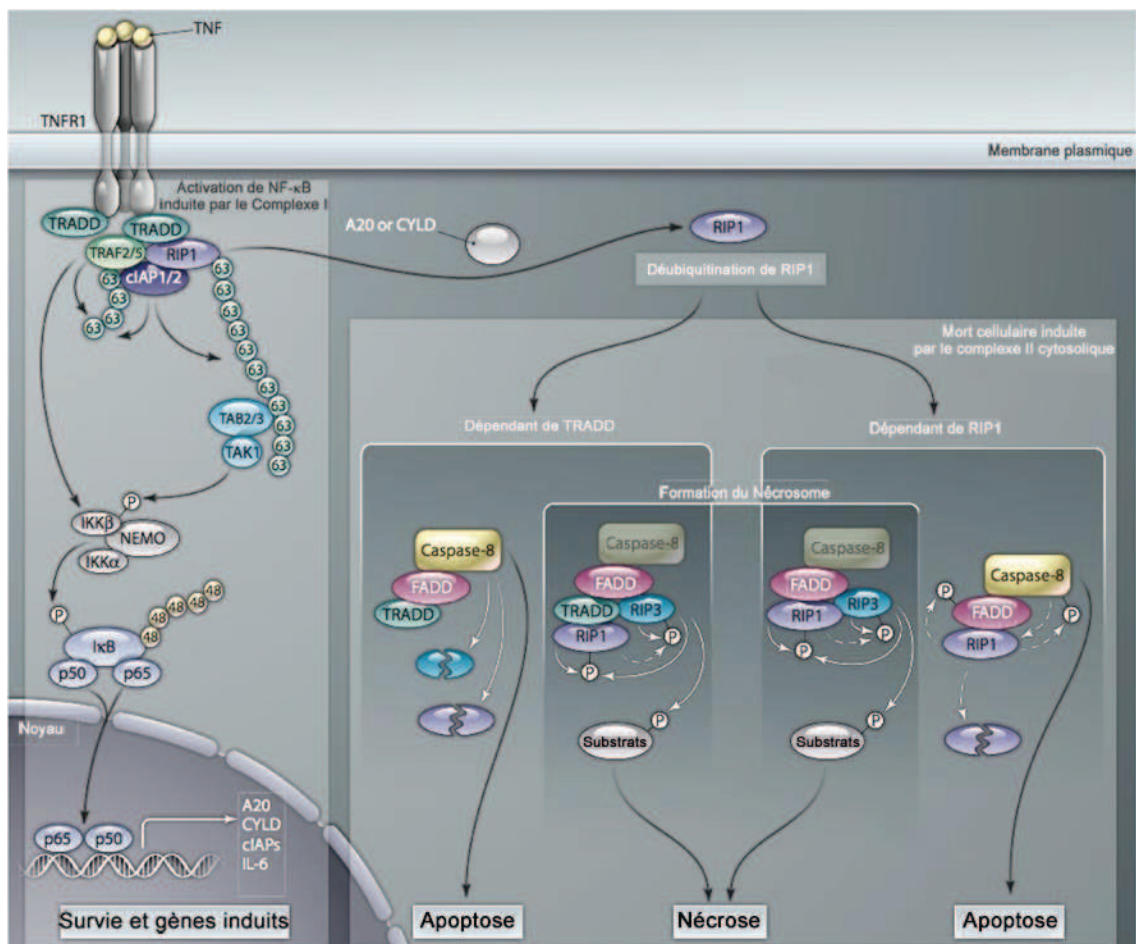


Figure 7 : Le nécrosome un complexe impliqué dans la nécrose induite par TNF.

D'après (Vandenabeele et al., 2010).

Complexe I membranaire: survie via MAPK/JNK or NFκB

Le complexe I est constitué à la membrane du ligand TNF lié au récepteur TNFR1, et des molécules adaptatrices RIP, TRADD et TRAF-1/2 (TNFR-associated factor). TNFR1 peut recruter la molécule adaptatrice TRAF2 via TRADD qui va initier

l'activation de la cascade de signalisation MAPK (mitogen-activating protein kinase)/JNK (c-jun NH(2)-terminal kinase). Ceci va aboutir à l'activation du facteur de transcription c-Jun qui est impliqué dans la signalisation de survie. La liaison de la protéine kinase RIP au TNFR1 via TRADD va stimuler aussi une autre voie de survie via l'activation de NFκB.

Complexe II cytosolique: Mort par apoptose via la caspase-8

Sous sa forme membranaire, le complexe I n'est pas lié à la molécule adaptatrice FADD qui permet normalement de recruter et d'activer la procaspase-8. En revanche, le complexe I peut être relâché dans cytosol où FADD, la procaspase-8 ou -10, et FLIP_{L/S} sont recrutés pour former le traddosome ou complexe II. L'activation de la procaspase-8 dans le traddosome va mener au clivage et à l'activation des caspases effectrices entraînant ainsi l'apoptose de la cellule.

Complexe II Nécrosome (cytosolique) : mort par necroptose via RIP1 et RIP3

Pendant longtemps, la nécrose a été considérée comme un mécanisme accidentel de mort cellulaire. D'un point de vue morphologique, la nécrose cellulaire se caractérise par 1) un gonflement de la cellule («oncosé») et des organites, particulièrement les mitochondries, 2) l'apparition de renflements membranaires, 3) d'une fragmentation de la chromatine nucléaire en amas compact aux contours irréguliers puis enfin 4) de l'éclatement cellulaire, stade ultime de la lyse cellulaire. La nécrose cellulaire s'accompagne donc de la libération du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire. Il est maintenant évident que la nécrose peut avoir lieu de manière contrôlée. Le terme nécroptose est récemment utilisé pour indiquer de manière générale une forme programmée de nécrose (Degterev et al., 2005) incluant les caractéristiques biochimiques suivantes : signalisation des récepteurs de mort, inhibition des caspases et activation des kinases RIP1 et/ou RIP3. La nécroptose peut être induite par divers stimuli, incluant les ligands de récepteurs de mort comme TNFα, des dommages cellulaires physiques ou chimiques et l'hypoxie cellulaire (Kaczmarek et al., 2013). La mort cellulaire programmée par nécrose peut se produire au cours du développement par exemple dans la mort des chondrocytes contrôlant la croissance longitudinale des os (Roach and Clarke, 2000) et dans l'homéostasie tissulaire chez l'adulte par exemple dans les cellules épithéliales intestinales. La nécroptose participerait ainsi à la physiopathologie de la maladie de Crohn (Gunther et al., 2011).

Comme il a été décrit au-dessus, le complexe II TNFR1 est impliqué dans l'activation de la mort cellulaire par apoptose, mais peut aussi être impliqué dans la mort cellulaire par nécrose. En effet, si l'activation de la caspase-8 est insuffisante dans le complexe II TNFR1 induite par la liaison du TNFR1 avec son ligand TNF α , un complexe alternatif peut se former, nommé le complexe nécrosome (Vandenabeele et al., 2010). Ce complexe nécrosome comprend FADD, TRADD, la caspase-8, RIP1 et RIP3 nécessairement requis pour l'initiation de la mort cellulaire nécroptotique. Comme il a été dit précédemment RIP1 peut être impliqué dans des complexes de mort et de survie cellulaire. Des modifications post-traductionnelles de RIP1 permettent de réguler finement la balance des fonctions de RIP1 entre l'apoptose, la signalisation NF- κ B de survie et la nécrose. Suite au clivage du domaine kinase de RIP1 et RIP3 par la caspase-8 activée au sein du complexe II cytosolique, la déubiquitination de RIP1 va favoriser la formation d'un complexe initiant la mort cellulaire par apoptose. Par contre, RIP1 sous sa forme polyubiquitinilé va favoriser l'activation du facteur de survie NF- κ B (Li et al., 2006a). En cas de défaut d'inactivation de RIP1 par la caspase-8 dans le complexe cytosolique II, la phosphorylation mutuelle de RIP1 et RIP3 va engager des événements de signalisation en aval qui vont mener à la mort cellulaire nécrotique (Cho et al., 2009).

De plus, il a été observé que le complexe I pouvait induire la production de ROS requise pour la mort cellulaire nécroptique en réponse à une stimulation au TNF α (Schulze-Osthoff et al., 1992).

De manière très intéressante, il a été montré que les protéines de la famille BCL-2 connues pour leur implication dans l'apoptose pouvaient aussi être impliquées dans la nécroptose induite par les récepteurs de mort. En effet, l'étude des gènes impliqués dans la régulation de la nécroptose et de l'apoptose a montré que parmi les 7 gènes impliqués dans ces deux morts cellulaires se trouvait *BMF*, membre pro-apoptotique de la famille BCL-2 (Hitomi et al., 2008).

3) Signalisation de type TLR: mort par apoptose

En réponse à la liaison du TLR-3, la caspase-8 peut être activée à travers un autre complexe contenant FADD (**Figure 5C**). Dans ce complexe, formé par l'assemblage du TLR-3 et de TRIF ou par auto-assemblage, RIPK1 est activé pour recruter FADD, qui

va lier et activer la caspase-8 et induire l'apoptose.

c) Les caspases

Le rôle des caspases-8 et -9 dans la mort cellulaire a été évoqué à plusieurs reprises dans les paragraphes précédents. Les Caspases (cysteine-dependent aspartate-specific proteases) sont les exécuteurs de la réponse apoptotique (Li and Yuan, 2008). Elles appartiennent à la famille des protéases et sont bien conservées dans les organismes multicellulaires. Ces protéases à cystéines qui clivent les protéines après un résidu d'acide aspartique. Les protéines de la famille des caspases possèdent une homologie de séquence, mais elles ne sont pas toutes impliquées dans l'apoptose. La première caspase à avoir été identifiée est la caspase-1 aussi connue sous le nom d'ICE (Interleukin-1 β Converting Enzyme) et qui est impliquée dans la maturation du pro-IL-1 β en forme active pro-inflammatoire (Thornberry et al., 1992), (Cerretti et al., 1992). À peu près au même moment, une voie génétique pour la mort cellulaire a été définie chez le nématode *C. elegans* (Ellis et al., 1991). Un des gènes dans cette voie génétique, *ced-3*, code pour une protéine qui est essentielle pour les 131 morts cellulaires programmées qui ont lieu au cours du développement hermaphrodite. Le clonage et le séquençage de *ced-3* a montré que les protéines ICE des mammifères étaient les orthologues de *ced-3* chez *C. elegans* de (Yuan et al., 1993).

(i) Classification

Les caspases peuvent être classées en 3 groupes en fonction de leurs structures et de leurs substrats: les caspases activatrices de cytokines impliquées dans l'inflammation (caspases -1, -4, -5, -12 chez l'humain et les caspases -1, -11 et -12 chez la souris), les caspases initiatrices de l'apoptose (caspases -2, -8, et -9 chez les mammifères et caspases -10 seulement chez la souris) et effectrices de l'apoptose (caspases -3, -6, -7 chez les mammifères) (McIlwain et al., 2013) (**figure 8**). Les caspases initiatrices sont activées par un signal apoptotique en amont puis elles vont activer en cascade les caspases effectrices pour mener la cellule vers une mort quasi certaine.

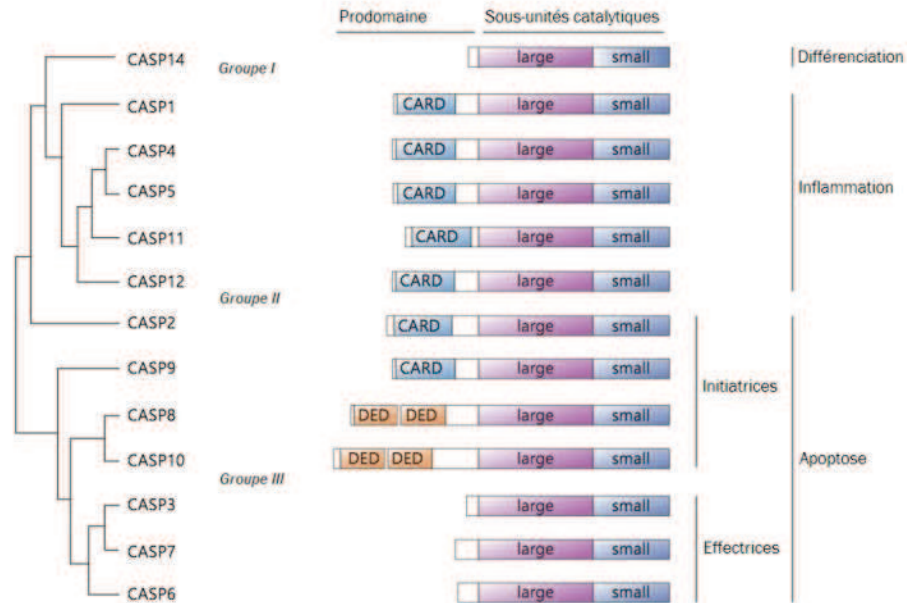


Figure 8 : Les différentes caspases.

Les caspases diffèrent au niveau de leur pro-domaine amino-terminal. Les caspases -3, -6, -7 et -14 sont des protéases à pro-domaine court. Les autres membres de la famille possèdent un pro-domaine long qui leur confère des capacités régulatrices cruciales au cours de l'apoptose. Les caspases -1, -2, -4, -5, -9, -11 possèdent un pro-domaine long de recrutement des caspases (CARD pour caspase activation and recruitment domains). Le domaine CARD permettra à ces caspases de recruter d'autres caspases et de les activer en cascade. Enfin, les caspases -8 et -10 présentent un domaine effecteur de mort (DED pour death effector domain). Le domaine DED permet l'interaction de ces caspases avec les récepteurs de mort cellulaire (voir paragraphe 3.2 ci-dessus). *D'après (Venero et al., 2013).*

(ii) Activation des caspases au cours de l'apoptose

Les caspases sont des protéases qui induisent les principaux changements morphologiques de la cellule au cours de l'apoptose. Comme la plupart des protéases et autres enzymes potentiellement dangereuses pour la cellule, les caspases sont synthétisées en tant que précurseurs inactifs ou zymogènes nommé pro-caspases. Au cours de l'apoptose, une fois activées (**figure 9**) elles vont cliver des protéines cibles spécifiques afin d'exécuter la mort cellulaire.

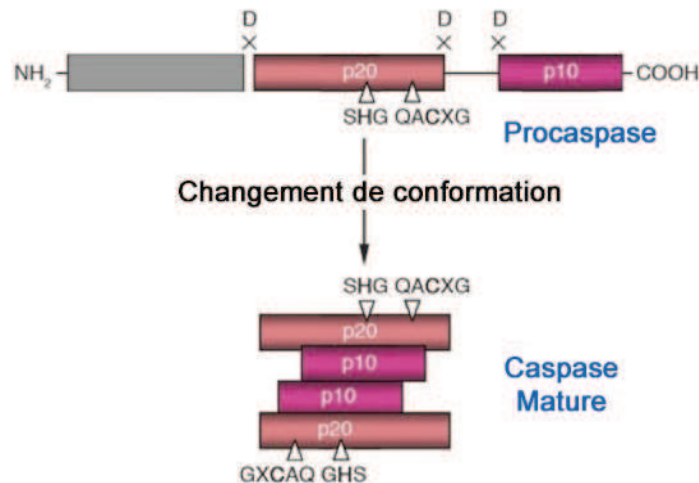


Figure 9 : Schémas de l'activation de la pro-caspase.
D'après (Lavrik et al., 2005).

Le clivage de la pro-caspase au niveau des liaisons Asp-X spécifiques va entraîner des changements de conformation par un processus auto-protéolytique formant une petite sous-unité p10 et une grande sous-unité p20, et menant à l'assemblage d'une enzyme hétérotétramérique active ou mature constituée de 2 sous-unités p10 et de 2 sous-unités p20 ($p20_2p10_2$) dont le pro-domaine est éliminé (Lavrik et al., 2005) (**figure 9**). Les résidus impliqués dans la formation du centre actif sont montrés.

Les caspases apoptotiques sont classées en 2 groupes ; les caspases en amont dites initiatrices (caspases -2, -8, -9 et -10) et les caspases en aval dites effectrices ou exécutrices (caspases -3, -6, -7).

(iii) Les caspases au cours des voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose

Dans la voie extrinsèque, la liaison des ligands de mort aux récepteurs de mort activés entraîne le recrutement de la pro-caspase-8 via son domaine DED au complexe DISC au niveau de la queue cytoplasmique du récepteur de mort. Ce complexe DISC comprend aussi les protéines adaptatrices FADD et TRADD. Le recrutement de monomères de la caspase-8 a pour conséquence sa dimérisation et son activation (Muzio et al., 1998). La caspase-8 ainsi activée va initier l'apoptose en clivant et activant directement les caspases effectrices (-3, -6 et -7). De plus, la caspase-8 peut

aussi activer la voie apoptotique intrinsèque à travers le clivage de BID comme mentionné précédemment.

Dans la voie intrinsèque, initié par divers stress intracellulaires, la rupture de la membrane mitochondriale externe va entraîner la libération du cytochrome C de la mitochondrie vers le cytosol. Le cytochrome C ainsi relâché va se lier à la molécule APAF-1 (apoptotic protease-activating factor-1) et former une structure heptamérique. Le changement de conformation d'APAF-1 dans cette structure va mener à l'exposition de son domaine CARD qui va recruter et se lier à la pro-caspase-9 via son domaine CARD (Acehan et al., 2002). Cette liaison va induire la dimérisation et l'activation de la caspase-9 (Shiozaki et al., 2002). La caspase-9 ainsi activée va activer par clivage les caspases effectrices (-3, -6 et -7).

Le clivage des caspases effectrices se fait entre la petite et la grande sous-unité et permet un changement de conformation de la protéine entraînant la formation d'un dimère de caspases effectrices qui va devenir une protéase mature fonctionnelle. Les caspases effectrices fonctionnelles vont être capable de cliver et d'activer d'autres caspases amplifiant ainsi la voie de signalisation apoptotique et menant à une mort cellulaire rapide. Par exemple, l'activation complète de la caspase-9 va se faire par une boucle d'amplification via la caspase-3. De même les caspases 3 et 7 peuvent activer la caspase-8 via la caspase dans une boucle de rétrocontrôle positive (Fujita et al., 2001). Ensuite, ces caspases effectrices activées vont cliver diverses protéines substrats spécifiques à l'origine de la plupart des événements biochimiques et structuraux de l'apoptose.

d) Substrats des caspases

Les principaux changements morphologiques de l'apoptose sont induits par les caspases. De récentes avancées technologies dans le domaine de la protéomique basée sur la spectrométrie de masse ont permis l'identification de centaines de substrats des caspases (van den Berg and Tholey, 2012). Au cours de l'apoptose, les caspases vont cliver les protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire, menant ainsi à

la mort cellulaire. Cette phase de l'apoptose est généralement considérée comme irréversible.

e) Fragmentation de l'ADN et désactivation de la réparation de l'ADN

La dégradation de l'ADN génomique en petits fragments est une des premières manifestations biochimiques de l'apoptose à avoir été identifiée. Cette fragmentation est le résultat du clivage de la chromatine dans les sites internucléosomales par des endonucléases, les CAD (caspase-activated deoxyribonuclease) (Liu et al., 1997). Dans les cellules non-apoptotiques CAD est en complexe avec son inhibiteur ICAD (Inhibitor of CAD) qui réprime son activité endonucléase. Au cours de l'apoptose, ICAD est clivée par la caspase-3, entraînant la libération de CAD qui va jouer son rôle de nucléase en fragmentant l'ADN (Enari et al., 1998). Au cours de l'apoptose, une des cibles précoces de la caspase-3 est la Poly(ADP-ribose) polymérase (PARP). PARP est une protéine nucléaire qui est impliquée dans la réparation de l'ADN endommagé. La caspase-3 va inactiver PARP par clivage, l'empêchant ainsi de réparer l'ADN (Boulares et al., 1999).

f) Désassemblage de la structure cellulaire

Cette fragmentation nucléaire va aussi être amplifiée par d'autres phénomènes biochimiques qui mettent en jeu les caspases. En effet, la désintégration de la lamine nucléaire et la destruction de l'enveloppe nucléaire vont participer à la fragmentation nucléaire. Les caspases vont contribuer aux premiers événements du désassemblage de la structure cellulaire. Notamment par la protéolyse des LAMINES A, B et C qui constitue une structure rigide permettant le maintien de la membrane nucléaire et l'organisation de la chromatine (Rao et al., 1996), mais aussi par le désassemblage du cytosquelette d'actine qui est lié à l'enveloppe nucléaire contribuant ainsi à la fragmentation nucléaire (Croft et al., 2005).

g) Rôle central de ROCK dans les processus apoptotiques

ROCK (Rho-associated protein kinase) appartient à la famille des kinases sérine/thréonine et sont modulées par les interactions avec les GTPases Rho. La famille

ROCK comprend ROCK1 et ROCK2 qui jouent un rôle central dans diverses fonctions cellulaires dont la contraction, l'adhésion, la migration, la prolifération cellulaire et l'apoptose (Street and Bryan, 2011). Les protéines ROCK sont des cibles directes de l'activité des caspases-2 et -3. Le clivage des protéines ROCK va induire une activation irréversible de leur activité kinase. Cette suractivation de la voie ROCK va modifier en profondeur la dynamique du cytosquelette d'actine et de la myosine (Sebbagh et al., 2001). ROCK2 peut aussi être clivé directement et activé par le granzyme B de manière indépendante des caspases menant à l'apoptose induite par les granules des lymphocytes cytotoxiques (Sebbagh et al., 2005). Les protéines ROCK et la dynamique de l'actine en aval jouent un rôle essentiel dans la formation et le bourgeonnement des corps apoptotiques (Sebbagh et al., 2001), la fragmentation nucléaire (Croft et al., 2005).

h) Les protéines régulatrices des caspases

Afin d'empêcher une mort inappropriée, les cellules possèdent des inhibiteurs spécifiques qui peuvent diminuer ou bloquer l'activation des caspases dont les protéines appartenant à la famille des protéines IAPs (Inhibitor of apoptosis proteins).

(i) Protéines inhibitrices des capsases : IAPs

1) *Structure et fonction des IAPs humaines*

Les protéines IAPs ont été identifiées pour la première fois dans le génome de Baculovirus où elles étaient capables d'inhiber l'apoptose dans des cellules d'insectes infectées (Crook et al., 1993). Par la suite, les IAPs ont été identifiés chez la drosophile (Hay, 2000), la levure (Uren et al., 1998) et les mammifères (Salvesen and Duckett, 2002).

Les IAPs sont caractérisés par la présence d'au moins un domaine BIR (Baculoviral IAP Repeat) en N terminale impliqué dans diverses interactions protéine-protéine (**Figure 10**). Chez les mammifères, huit IAPs ont été identifiées dont NAIP (neuronal apoptosis-inhibitor protein or BIRC1), c-IAP1 (BIRC2), c-IAP2 (BIRC3), XIAP (X-

linked IAP ou BIRC4), survivine (BIRC5), Apollon/Bruce (BIRC6), ML-IAP (melanoma IAP, Livin ou encore BIRC7) et ILP2 (IAP-like protein-2 ou BIRC8 (de Almagro and Vucic, 2012).

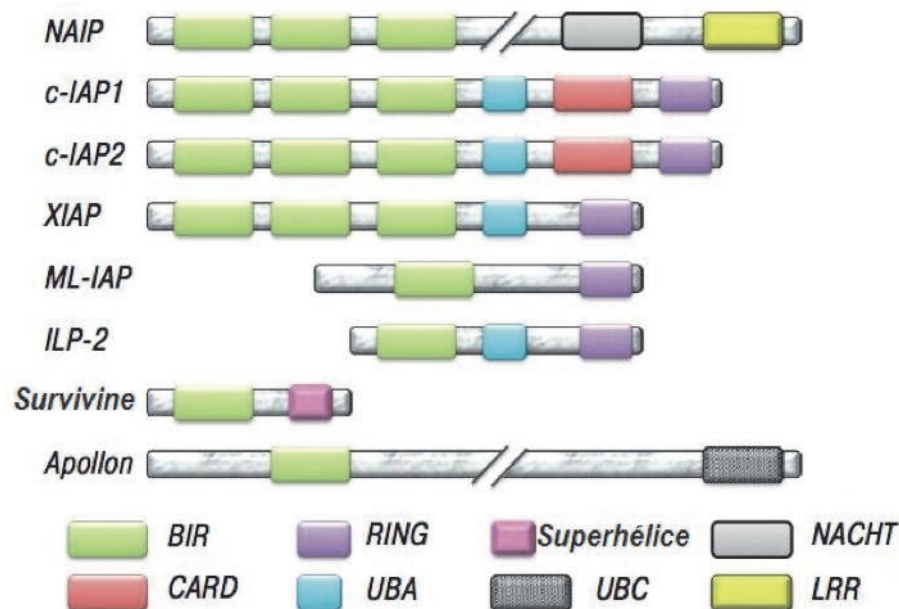


Figure 10 : Représentation schématique de la structure des huit IAPs humaines.
D'après (de Almagro and Vucic, 2012).

Les IAPs ont une activité ligase ubiquitine E3 et possèdent des domaines d'interactions protéine-protéine. Les IAPs peuvent lier les caspases et induire leur ubiquitylation menant à leur dégradation par le protéasome. Ces huit IAPs humaines possèdent un à trois domaines BIR. Parmi ces IAPs humaines, XIAP, cIAP1 et cIAP2 partagent en commun trois domaines BIR permettant la liaison des IAPs avec les caspases, un domaine UBA (Ubiquitin-associated) permettant la liaison aux protéines polyubiquitylées qui permet le recrutement des IAPs au niveau des complexes protéiques (Blankenship et al., 2009) et un domaine RING (Really Interesting New Gene) en C terminale. Le domaine RING permet une homo- ou hetero-dimerisation qui régule leur stabilité et est requis pour l'activité ubiquitine E3 ligase. Le domaine RING est un domaine en doigt de zinc qui est impliqué dans le transfert d'ubiquitine vers une protéine cible (de Almagro and Vucic, 2012). Les IAPS peuvent induire l'ubiquitylation des protéines avec lesquelles elles interagissent, mais sont aussi capables d'induire leur propre ubiquitylation. Il a aussi été montré que le domaine RING de cIAP1 permettait la

liaison directe avec le domaine RING de XIAP, causant son ubiquitylation et sa dégradation par le protéasome, régulant ainsi l'abondance des IAPs (Silke et al., 2005). De plus, cIAP1 et cIAP2 possèdent un domaine CARD (Caspase Recruitment Domain). Il a été récemment identifié que le domaine CARD de cIAP1 était essentiel pour son autorégulation, en inhibant son activité Ubiquitine E3 Ligase en empêchant la dimérisation du domaine RING et l'activation de l'enzyme E2 de conjugaison de l'ubiquitine. De plus, cette auto-régulation est aussi nécessaire pour optimiser l'inhibition de l'apoptose dépendante de la caspase-8 (Lopez et al., 2011).

La protéine XIAP est considérée comme le plus efficace des régulateurs apoptotiques car elle est capable d'inhiber directement l'activité des caspases (Eckelman et al., 2006). XIAP peut réguler la voie d'activation des caspases de manières distinctes. Premièrement XIAP peut se lier directement à la caspase-9 active dans l'apoptosome et inhiber son activité. Deuxièmement XIAP peut aussi se lier directement et inhiber les caspase-3 et -7 actives (Bratton et al., 2001), (Deveraux et al., 1997). XIAP peut inhiber directement l'activité des caspases en empêchant l'accessibilité au substrat ou en masquant le domaine catalytique des protéases (Eckelman et al., 2006) et /ou en induisant l'ubiquitylation (Suzuki et al., 2001) qui va mener les caspases à la dégradation par le protéasome. Le motif BIR2 de XIAP va lier fortement et inhiber les caspases-3 et -7 mais pas la caspase-9, et au contraire le motif BIR3 de XIAP va cibler et inhiber spécifiquement la caspase-9 mais pas les caspases-3 et -7 (Deveraux et al., 1997), (Deveraux et al., 1998). Ces domaines BIR2 et BIR3 sont des domaines BIRs capables de lier des motifs IBM (IAP-binding motif) exposés chez les caspases tétramériques actives et les antagonistes des IAP (Srinivasula et al., 2001).

(ii) Protéines inhibitrices des IAP

Les antagonistes des IAP les plus étudiés sont les molécules pro-apoptotiques de la famille Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase)/ (direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding protein with low pI) comprenant Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 (omi stress-regulated endoprotease/High temperature requirement protein A2) chez les mammifères et Reaper, Grime et Hid chez la Drosophile (Goyal et al., 2000). Ces protéines mitochondriales ne partagent qu'un motif commun, le motif N terminal IBM. Suite à un stimulus apoptotique, la perméabilisation de la membrane

externe mitochondriale régulées par les protéines de la famille BCL-2 vont entraîner le relâchement de ces protéines mitochondrial vers le cytoplasme où elles vont pouvoir interagir avec les IAPs grâce à leur motif IBM favorisant ainsi l'activation de l'apoptose (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004).

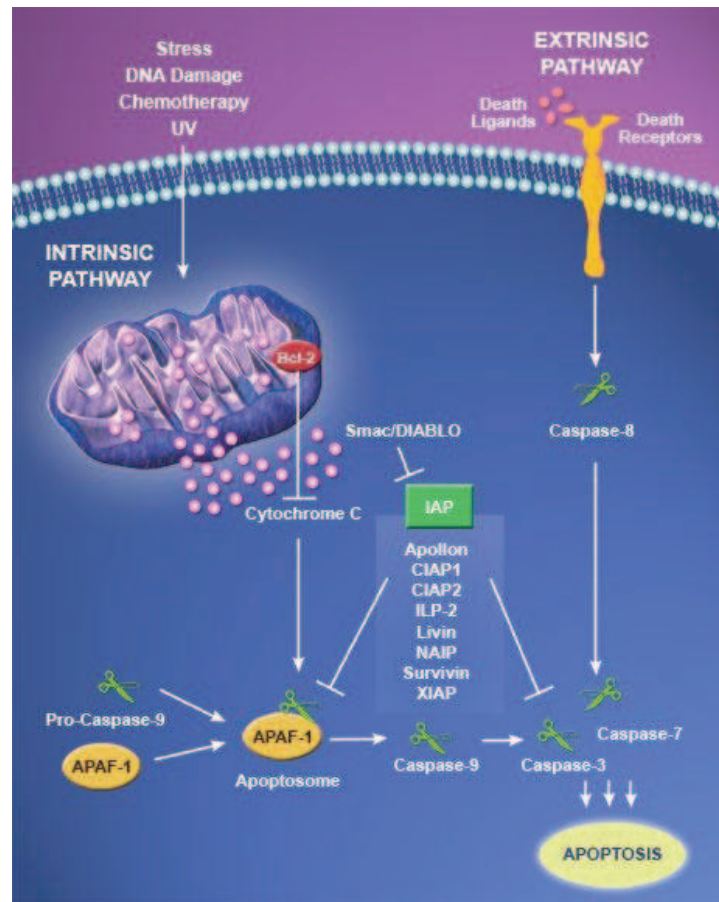


Figure 11 : Les protéines IAPs inhibent l'apoptose en liant les caspases activées.

Elles inhibent le signal généré à travers les voies intrinsèques (voie mitochondriale) et extrinsèques (voie des récepteurs de mort) de l'apoptose.

Smac/DIABLO peut se lier aux domaines BIR2 et BIR3 des capsases-3 et -9 et antagoniser l'inhibition de XIAP (Huang et al., 2003). Les cIAPs peuvent aussi induire l'ubiquitylation et la dégradation de Smac/DIABLO (Hu and Yang, 2003). Et inversement, Smac/DIABLO peut induire l'auto-ubiquitylation et la dégradation des cIAPs (Blankenship et al., 2009).

En cancérologie, des « mimics » de SMAC qui miment l'activité de SMAC sont utilisées pour induire l'apoptose des cellules cancéreuses. Une étude récente de *Greer et*

al. montre l'efficacité de sensibilisation à l'apoptose du « mimic » SMAC JP1201 sur les lignées cellulaires de cancer pulmonaires (NSCLC), en synergie avec des agents chimiothérapeutiques, qui seuls n'induisaient pas l'apoptose de ces lignées cellulaires (Greer et al., 2011).

Omi/HtrA2 est une sérine protéase qui lie et inactive les cIAPs et XIAP par un clivage protéolytique irréversible (Verhagen et al., 2002). L'expression transcriptionnelle de *Omi/HtrA2* est ensuite induite sous le contrôle de P53 après des dommages à l'ADN (Jin et al., 2003).

i) Autres protéases impliquées dans l'apoptose

En plus des caspases, d'autres protéases sont impliquées dans la mort cellulaire apoptotique comme la sérine protéase granzyme B, les calpaïnes et l'endonucléase G.

(i) Granzyme B

Le granzyme B est une sérine protéase qui a la capacité de cliver les protéines après un acide aspartique (Otake et al., 1991). Cette protéase est sécrétée par les lymphocytes T cytotoxiques par exocytose en réponse à des cellules tumorales ou infectées par des pathogènes. Le granzyme B peut être internalisé par endocytose dans les cellules cibles. Une fois relâchée dans le cytosol de la cellule cible, le granzyme B peut cliver directement certaines caspases effectrices comme la caspase-3 (Atkinson et al., 1998), la protéine pro-apoptotique BID (famille BCL-2) qui va activer la voie mitochondriale de l'apoptose (Alimonti et al., 2001), mais aussi ICAD qui va mener à la dégradation de l'ADN (Thomas et al., 2000).

(ii) Calpaïnes

Les calpaïnes sont des cystéines protéases non-lysosomales, activées par le calcium (Ca^{2+}) et qui se localisent au cytosol et à la mitochondrie (Smith and Schnellmann, 2012). Des travaux ont mis en évidence l'implication des calpaïnes dans la régulation de l'apoptose par le clivage de certaines molécules impliquées dans l'apoptose. Par exemple, *Vindis et al.* ont mis en évidence le rôle essentiel des calpaïnes dans l'apoptose des cellules endothéliales microvasculaires humaines. L'apoptose stimulée par LDL-oxidée (Low Density Lipoprotein), augmente le Ca^{2+} intracellulaire

activant ainsi les calpaïnes qui vont cliver la protéine BID en forme tronquée (t-BID) induisant la voie mitochondriale de l'apoptose (Vindis et al., 2005).

(iii) Endonucléase G

L'endonucléase G (EndoG) est une nucléase spécifique de la mitochondrie qui va se relocaliser dans le noyau au cours de l'apoptose. Une fois dans le noyau, l'EndoG va cliver l'ADN en petits fragments. Il a été mis en évidence que l'EndoG induisait la fragmentation de l'ADN de manière indépendante de la voie des caspases dans les cellules MEFs (mouse embryonic fibroblasts) (van Loo et al., 2001).

II. LES FORMES NON-APOPTOTIQUES DE MORT CELLULAIRE

En parallèle de l'apoptose, il existe d'autres formes de mort cellulaire récemment découvertes ou en cours de caractérisation. Mais il n'est pas encore possible d'établir clairement si ce sont des mécanismes de mort cellulaire distincts ou des processus menant à l'apoptose ou à la nécrose cellulaire. L'exemple de la mort cellulaire par nécrose induite par RIP1 ou nécroptose a été évoqué dans la **partie 2) Signalisation de type TNFR1 du présent chapitre**. Parmi les autres formes de mort cellulaires, on peut citer, les termes entose, parthanatos, pyroptose, netose et cornification (Galluzzi et al., 2012). Pour le moment, il n'a pas été montré d'implication de la protéine BAX dans ces formes de mort cellulaire « non-apoptotiques ».

Cependant, il a aussi été mis en évidence que BAX était impliqué dans la nécrose indépendante des caspases induite par AIF (apoptosis inducing factor) en cas de dégâts massifs à l'ADN (Delavallee et al., 2011). AIF est une protéine dite « Janus » car elle possède une activité redox « non-apoptotique » dans la mitochondrie et une fonction pro-apoptotique dans le noyau. Il a été mis en évidence récemment par l'utilisation de cellules embryonnaires de souris KO que BID régulait la nécrose indépendante des caspases induite par AIF en induisant l'activation de BAX en cas de dégâts massifs à l'ADN (**figure 12**).

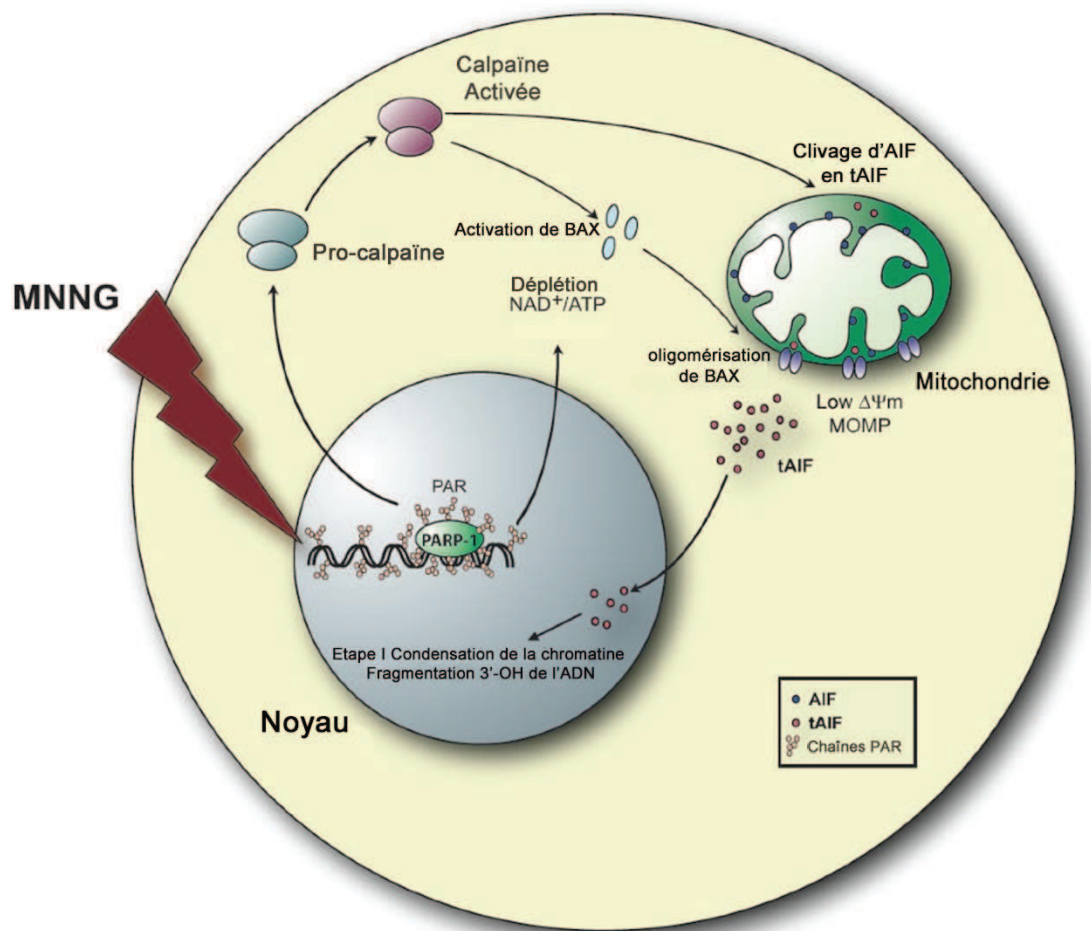


Figure 12 : La nécrose cellulaire médiée par AIF. Le MNNG (N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine) est un agent anti-cancéreux alkylant.

D'après (Rana S. Moubarak et al., 2007).

Ces dégâts massifs à l'ADN vont activer de manière incontrôlée la machinerie de réparation de l'ADN induite par PARP. La suractivation de PARP va consommer la totalité du stock cellulaire en NADPH et induire une crise énergétique majeure dans la cellule. Dans cette configuration, la cellule n'a pas les réserves énergétiques nécessaires pour activer les caspases. Cependant, un mécanisme de secours non-apoptotique médié par AIF va être activé. Dans ce modèle, BID une fois activé par clivage par la calpaïne, va se relocaliser à la mitochondrie où il va activer BAX. BAX va alors pouvoir induire le relargage de AIF de la mitochondrie vers le cytosol. AIF va alors se transloquer dans le noyau pour activer la cyclophyline A, une enzyme de dégradation de l'ADN et induire la mort de cellule (Cabon et al., 2012).

III. LES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2

De la découverte de *BCL-2* en 1988 (Vaux et al., 1988) à nos jours, au moins 19 protéines appartenant à la famille BCL-2 ont été découvertes et identifiées chez les mammifères. Les protéines appartenant à la famille BCL-2 sont les régulateurs clés de la voie mitochondriale de l'apoptose. Leur fonction primaire (historique) est de contrôler la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) qui va activer la voie intrinsèque de l'apoptose décrite dans le sous-chapitre précédent.

1) Généralités sur la structure des protéines de la Famille BCL-2

Les protéines de la famille BCL-2 partagent quatre régions d'homologie appelées les domaines d'homologie à BCL-2 (BH1, BH2, BH3 et BH4) et peuvent posséder des activités pro- ou anti-apoptotiques (**figure 13**). Ainsi, les membres de la famille BCL-2 identifiés ont été classés en trois sous-groupes en fonction de leur action anti- et pro-apoptotiques et des domaines d'homologie à BCL-2 qu'ils possèdent.

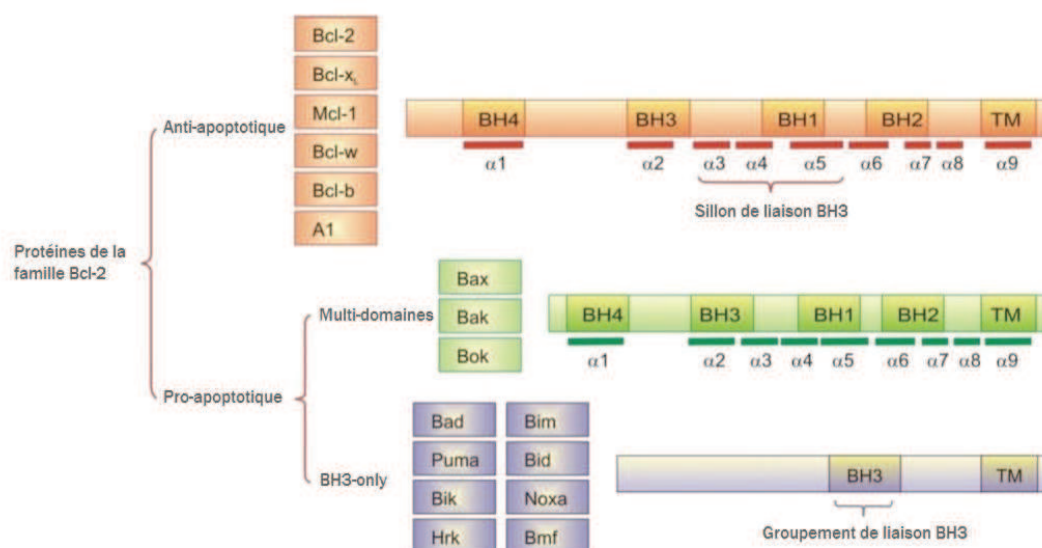


Figure 13: Les membres de la famille des protéines BCL-2.

La famille Bcl-2 comprend 1) les membres anti-apoptotiques qui contiennent les domaines BH (BCL-2 homology) BH1 à BH4 et un domaine transmembranaire TM comme Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, Bcl-w, Bcl-b et A1, 2) les membres pro-apoptotiques à multi-domaines qui contiennent les domaines BH1 à BH4 et un domaine TM comme Bax, Bak et Bok et 3) les membres pro-apoptotiques à domaine BH3-unique (« BH3-only ») avec un domaine TM comme Bad, Puma, Bik, Hrk, Bim, Bid, Noxa, Bmf. Les membres anti-apoptotiques et pro-apoptotiques possèdent 9 hélices α. *D'après (Bajwa et al., 2012).*

Ainsi, les membres anti-apoptotiques de la famille à multi-domaines BH inhibent la mort cellulaire. Ce groupe comprend les protéines anti-apoptotiques de la famille comme BCL-2 (B-cell CLL/lymphoma 2), BCL-xL (B-cell lymphoma-extra large), MCL-1 (Myeloid cell leukemia sequence 1), BCL-w (B-cell lymphoma W), BCL-B (Bcl-2-like-10 protein), BFL-1/A1 (BCL2-related protein A1 or Bcl-2 related gene in fetal liver). Ces protéines partagent les 4 domaines BH et un domaine transmembranaire (TM).

Les membres pro-apoptotiques peuvent être classés en deux sous-groupes. Le premier sous-groupe comprend les protéines pro-apoptotiques de la famille à multiples domaines BH (BH1 à BH4) comme BAX (Bcl-2 associated X protein), BAK (Bcl-2 antagonist or killer), et BOK (Bcl-2 related ovarian killer). On distingue un second sous-groupe de protéines pro-apoptotiques qui possèdent seulement le domaine BH3 et un domaine TM. Les protéines à domaine BH3 unique dites « BH3-only » sont les protéines BAD (BCL2 associated agonist of cell Death), PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis), BIK (BCL2-interacting killer), HRK/DP5 (Harakiri BCL-2 interacting protein/ death protein 5), BIM (Bcl-2 interacting mediator of cell death), BID (BH3 interacting domain death agonist), NOXA (ou PMAIP1 pour phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1), et BMF (BCL2 modifying factor). La particularité de ces protéines est de pouvoir moduler à la fois la fonction des membres anti-apoptotiques et des facteurs pro-apoptotiques à domaine multiple BH de la famille BCL-2.

2) Identification et fonctions des membres de la famille BCL-2 dans l'apoptose.

Des différences dans les profils d'interactions et d'expression des protéines de la famille BCL-2 leur confèrent des fonctions particulières au sein d'un même groupe (anti-apoptotiques, pro-apoptotiques à domaine BH multiples ou BH3 unique). L'étude fonctionnelle chez les souris invalidées pour ces gènes permet déjà d'apprécier la diversité des fonctions jouées par ces protéines au cours du développement embryonnaire et dans l'homéostasie cellulaire en général (**voir tableau 1**).

a) Les membres anti-apoptotiques

De manière générale, la fonction des membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 est d'interagir et de séquestrer les protéines pro-apoptotiques de la famille BCL-2 à domaine BH3 unique et à multi-domaines BH, afin d'inhiber l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose (**voir paragraphe IV, 3) Régulation des fonctions apoptotiques de BAX pour un modèle plus détaillé**)).

(i) *Bcl-2* - « B-cell CLL/lymphoma 2 »

Le gène *BCL-2* a été le premier gène de la famille *BCL-2* à être découvert. En effet, certains lymphomes folliculaires humains présentaient une translocation chromosomale t(14 ;18) impliquant le gène *BCL-2* (Tsujiimoto et al., 1984). Ce réarrangement plaçait *BCL-2* sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde de l'immunoglobuline (IgH) ce qui augmentait de manière excessive son expression dans les lymphomes folliculaires (Bakhshi et al., 1985), (Cleary et al., 1986). De manière inattendue, l'équipe de Jerry Adams a montré pour la première fois en 1988 que la surexpression de *BCL-2* dans les cellules B en absence de facteur de survie IL-3 induisait une résistance des cellules à l'apoptose (Vaux et al., 1988). Cette découverte introduisait un nouveau modèle d'oncogène capable d'induire la survie cellulaire par une fonction anti-apoptotique plutôt qu'en induisant la prolifération cellulaire comme la plupart des oncogènes découvert auparavant (comme les oncogènes viraux). Comme la plupart des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2, la protéine BCL-2 possède un domaine hydrophobique C terminale permettant un ancrage à la membrane (Nguyen et al., 1993). Ainsi, BCL-2 peut être retrouvé ancré à la membrane mitochondriale, du réticulum endoplasmique (RE), et à l'enveloppe nucléaire (Lithgow et al., 1994). Bcl-2 est principalement régulé au niveau post-traductionnel. *BCL-2* peut être régulée négativement par phosphorylation via la voie JNK (Xiao et al., 2004). En effet, la phosphorylation de BCL-2 induite en réponse à un composé organosulfuré, le DATS (diallyl trisulfide) diminue l'interaction de BCL-2 avec BAX, entraînant l'apoptose des cellules PC-3 (lignées humaines de cancer de la prostate). De plus, il a été montré que la phosphorylation de BCL-2 induite par JNK-1 avait un rôle double en régulant à la fois l'apoptose et l'autophagie (Wei et al., 2008). Ce rôle de BCL-2 dans l'autophagie sera abordé dans le paragraphe des fonctions non-apoptotiques de la famille BCL-2. En plus

de la voie JNK, l'activité anti-apoptotique de BCL-2 peut être aussi augmentée par la voie ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2). In vitro, l'activation des kinases ERK1/2 par l'interleukine IL-3 va directement phosphoryler BCL-2 (Serine-70) au niveau de la mitochondrie protégeant les cellules NSF/N1.H7 (lignée cellulaire myéloïdes murine dépendantes d'IL-3) de l'apoptose induite par la staurosporine (Deng et al., 2000). De manière complémentaire, la déphosphorylation de BCL-2 va réguler négativement l'activité anti-apoptotique de la protéine (Deng et al., 2009). In vitro la déphosphorylation de BCL-2 induite par PP2A (protéine phosphatase 2A) entraîne une augmentation de liaison BCL-2/P53 pour induire l'apoptose des cellules H7 (cellules souches embryonnaires humaines). Les souris *Bcl-2*^{-/-} ont permis de mettre en évidence le rôle essentiel de BCL-2 au cours du développement embryonnaire. Les souris *Bcl-2*^{-/-} montrent une forte mortalité postnatale. À l'âge adulte, les souris sont de petite taille et présentent une involution du thymus et de la rate, une maladie polykystique rénale, des poils hypopigmentés dus à une augmentation d'apoptose. Ces souris souffrent aussi d'une réduction du nombre de neurones (Cheng et al., 2001), (Coultas et al., 2004), (Veis et al., 1993), (Bouillet et al., 2001).

(ii) Bcl-xl - « B-cell lymphoma-extra large » (BCL2-like 1, BCL2L1)

En 1993, *Boise et al.* isolent pour la première fois le gène *BCL-x* qui code pour plusieurs variants d'ARNm issus d'épissage alternatif, dont *BCL-xL* et *BCL-xS*. Les auteurs ont montré des fonctions opposées pour ces deux isoformes. En effet, BCL-xL inhibe la mort cellulaire en absence de facteur de croissance. Par contre BCL-xS inhibe la capacité de BCL-2 à favoriser la survie des cellules en absence de facteurs de croissance. De plus, in vivo, BCL-xS est fortement exprimé dans certaines cellules en différenciation, comme les lymphocytes en développement. Par contre, BCL-xL est retrouvée dans les tissus contenant des cellules post-mitotiques (en phase G0 d'arrêt du cycle cellulaire) à long terme comme dans le cerveau humain (Boise et al., 1993). Récemment il a été montré que BCL-xL était impliqué dans la formation des synapses neuronales de rats. En effet, BCL-xL peut stimuler le changement morphologique de la membrane mitochondriale en régulant Drp1 (une GTPase qui participe à la fission membranaire des mitochondries), ce qui va altérer la fonction mitochondriale de façon à stimuler la formation des synapses des neurones d'hippocampe de rats (Li et al., 2008).

BCL-xL peut être régulé au niveau post-traductionnel et transcriptionnel. En effet, la phosphorylation de *BCL-xL* peut être induite par des agents qui perturbent l'architecture des microtubules (par exemple la colchicine) entraînant l'apoptose de lignées cellulaires tumorales (Poruchynsky et al., 1998). En absence de facteurs de croissance, *BCL-xL* peut être régulée positivement au niveau transcriptionnel via la voie JAK/STAT (Janus kinase-signal transducer and activator of transcription), CD40 via la voie NF- κ B pour inhiber la mort dans les lignées cellulaires U266 (cellules humaines du sang périphériques) et les cellules B respectivement (Grad et al., 2000). L'expression de *BCL-xL* peut être régulé négativement par la voie du TGF- β dans les lymphocytes T humains pour induire la mort cellulaire (Spender et al., 2009). Les souris *Bcl-x/-* montre le rôle essentiel de *BCL-xL* dans le développement embryonnaire. En effet, les souris *Bcl-x/-* meurent au jour E13.5 à cause d'une apoptose massive des cellules hématopoïétiques et des cellules neurales (Motoyama et al., 1995).

(iii) *Mcl-1* - « myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related) »

MCL-1 a été identifié pour la première fois comme un gène exprimé de manière précoce lors de la différenciation monocyte/macrophage induite par le PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate) dans les cellules humaines leucémiques myéloïdes ML-1 (Kozopas et al., 1993). *MCL-1* est requis pour le développement neural et le maintien des lymphocytes B et T. De plus, *MCL-1* est impliqué dans la régulation de l'apoptose des macrophages et des neutrophiles. Cette protéine est aussi essentielle pour la survie des cellules souches hématopoïétiques et des fibroblastes synoviaux (Thomas et al., 2010). Chez la souris, la suppression de *MCL-1* bloque l'implantation embryonnaire et est précocement létale pour l'embryon (Rinkenberger et al., 2000). *MCL-1* se lie fortement à NOXA et PUMA mais faiblement à BAD et peut se lier aussi préférentiellement à BAK. *MCL-1* est capable de protéger les cellules de l'apoptose en absence de facteur de croissance. Son expression peut être induite par des cytokines comme les interleukines IL-3, IL-5, IL-6, GM-CSF (Granulocyte macrophage colony stimulating factor), EGF (Epidermal growth factor) et VEGF (Vascular endothelial growth factor) (Chen et al., 2005). Selon le type et le contexte cellulaire, *MCL-1* peut être localisée à la membrane mitochondriale des cellules (Yang et al., 1995b) et dans le cytosol (Leuenroth et al., 2000). De plus, des études ont montré une localisation de

MCL-1 au niveau de l'enveloppe nucléaire des leucocytes polymorphonucléaires (PMN) humains (Leuenroth et al., 2000). MCL-1 est aussi présente dans le noyau des leucocytes PMN, les cellules HL-60 (lignée cellulaire myéloblastiques humaines), TF-1 (lignée cellulaire érytroleucémiques humaines) et Jurkat (lignée cellulaire lymphocytes T humaines) (Jamil et al., 2005), (Fujise et al., 2000), (Leuenroth et al., 2000). Dans ces études, la localisation nucléaire de MCL-1 a été attribuée à son interaction avec PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) et CDK-1 (Cyclin-dependent kinase 1) et suggère un rôle de MCL-1 dans l'inhibition de la progression du cycle cellulaire. La régulation moléculaire de ses interactions et son transport vers le noyau n'est pas encore connue. Au cours d'un stimulus apoptotique, MCL-1 peut être régulé négativement par et phosphorylation (via JNK), par ubiquitination et clivage (via β -TrCP) (Thomas et al., 2010).

(iv) Bcl-w - « B-cell lymphoma W » (BCL2-like 2, BCL2L2)

BCL-w a été identifié et cloné en 1996 par *Gibson et al.* par PCR dans un lymphome folliculaire humain. Cette protéine montre des capacités similaires à BCL-2 et BCL-xL pour inhiber l'apoptose. Les auteurs montrent une expression rare de l'ARNm de *Bcl-w* dans les lignées cellulaires lymphoïdes B et T, mais *Bcl-w* est retrouvée exprimer dans presque toutes les lignées cellulaires myéloïdes murines et dans une large gamme de tissus (Gibson et al., 1996). *Pritchard et al.* montrent par immunoblot une expression de BCL-w dans le petit intestin et le colon des souris ainsi que dans des lignées tumorales humaines d'origine épithéliales dont les lignées de carcinome de côlon. De plus, ces auteurs montrent une implication de BCL-w dans l'apoptose induite par divers dommages dans des cellules épithéliales du petit intestin. L'absence de *BCL-w* améliore l'apoptose de ces cellules (Pritchard et al., 2000). Dans les cellules saines, BCL-w est détaché de la membrane mitochondriale, mais est convertie en une protéine membranaire intégrale de la mitochondrie suite à son interaction avec la protéine à domaine BH3 unique BIM dont l'expression est induite par différents signaux cytotoxiques. L'étude de la structure de BCL-w a révélé que son domaine COOH-terminal occupe le sillon hydrophobique qui masque le domaine BH3 (Hinds et al., 2003). Le déplacement de ce domaine par le domaine BH3 modifie la conformation de la partie hydrophobique COOH-terminale, permettant son insertion

dans la membrane mitochondriale, neutralisant ainsi sa fonction anti-apoptotique (Wilson-Annan et al., 2003). Les souris mâles *Bcl-w*^{-/-} sont stériles suite à un défaut de spermatogenèse (Print et al., 1998).

(v) Bfl-1/A1 - “BCL2-related protein A1 or Bcl-2 related gene in fetal liver” (BCL2A1)

A1, l’homologue murin de *BFL-1* humain a été identifié en 1991 comme un gène transcrit précocement dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse en réponse au facteur de croissance GM-CSF (Orlofsky et al., 1991). L’homologue murin A1 peut se relocaliser dans le noyau grâce à sa séquence de localisation nucléaire (NLS) (Somogyi et al., 2001). En 1993 Lin et al. reporte l’expression d’A1 dans le thymus, la rate, la moelle osseuse, les lymphocytes T helper, les macrophages, les neutrophiles, mais pas dans les lignées non-hématopoïétiques (Lin et al., 1993). Peu après, l’expression de BFL-1 est identifiée dans le foie fœtal humain à deux semaines de gestation (Choi et al., 1995). Le gène humain *BFL-1* code pour une forme entière qui est localisée à la mitochondrie et un variant d’épissage alternatif plus court (*BFL-1_s*) (manquant 12 acides aminés en C terminal). Cette forme courte est localisée dans le noyau, mais possède toujours une fonction anti-apoptotique. Ce variant est principalement retrouvé dans les ganglions lymphatiques normaux et les cellules de leucémie lymphocytaire B (Ko et al., 2003). Les transcrits *BFL-1* sont induit en réponse à l’activation du facteur de transcription NF-κB dans différents types cellulaires (Zong et al., 1999), (Ottina et al., 2012). Il a aussi été montré que BFL-1 pouvait être converti en facteur pro-apoptotique par clivage protéolytique par la μ -calpaïne en réponse au TNF (tumor necrosis factor) en présence de cycloheximide dans les cellules pro-B FL5.12 murines (Kucharczak et al., 2005). Parmi les cibles de facteur anti-apoptotique, l’interaction de la protéine A1 avec la protéine pro-apoptotique BAX est encore controversée. En effet, des études par une approche de double hybride chez la levure montrent que BFL-1 peut interagir avec BAX (Zhang et al., 2000), (Tao et al., 1997) et BAK (Tao et al., 1997). Cependant, d’autres études menées dans un contexte plus physiologique (dans les cellules Hela et dans les cellules COS (fibroblastes like cell dérivées de tissu de rein provenant de singe) montrent une forte association entre A1/BFL-1 avec BAK endogène mais pas BAX (Simmons et al., 2008), (Holmgreen et al., 1999). Il faut noter que les neutrophiles des souris *A1*^{-/-} montrent une augmentation de l’apoptose spontanée et une plus grande

sensibilité à l'apoptose induite par le LPS (Lipopolysaccharide) (Hamasaki et al., 1998), (Orlofsky et al., 2002).

(vi) Bcl-B - "Bcl-2-like-10 protein" (Bcl-2-L-10)

BCL-B est le dernier membre anti-apoptotique humain de la famille *BCL-2* à avoir été identifié (Ke et al., 2001), (Zhang et al., 2001). *Zhai et al.* ont montré que *BCL-B* pouvait se lier à *BCL-2*, *BCL-xL* et *BAX* mais pas à *BAK*. *BCL-B* pouvait ainsi inhiber l'apoptose induite par la surexpression de *BAX* mais non par *BAK* (Zhai et al., 2003). De plus, la délétion de son domaine transmembranaire altère son association avec les organelles intracellulaires et diminue son action anti-apoptique (Ke et al., 2001). *Krajewska et al.* observent par immunohistochimie, une expression de *BCL-B* dans les tissus normaux, une expression principale dans les plasmocytes, et une surexpression dans les tumeurs solides, les adénocarcinomes pulmonaires, colorectaux, gastrique, du sein et la moitié des lymphomes B à large cellule (Krajewska et al., 2008). Son homologue murin Boo/Diva ne partage que la moitié de son identité d'acides aminés et son expression est restreinte aux ovaires et aux testicules chez la souris (Song et al., 1999).

b) Les membres pro-apoptotiques à multidomaines

BAX et *BAK* sont les membres majeurs de ce sous-groupe des protéines de la famille *BCL-2*. Au cours de l'apoptose, les protéines pro-apoptotiques *BAX* et *BAK* subissent un changement de conformation menant à leur oligomérisation et à leur insertion dans la membrane externe de la mitochondrie pour former des pores, aboutissant à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et à l'activation de la cascade des caspases (Chipuk and Green, 2008). Chez les mammifères, une surexpression de ces effecteurs pro-apoptotiques entraîne la mort cellulaire. La régulation de l'activation de *BAX* et *BAK* par les membres anti-apoptotiques et les pro-apoptotiques à domaine BH3 de la famille *BCL-2* est décrite plus en détail au sous-chapitre suivant.

(i) Bax - « BCL2-associated X protein »

La découverte, les caractéristiques et les fonctions de *BAX* seront le sujet du **paragraphe IV. La protéine BAX dans l'apoptose du présent sous chapitre.** *BAX*

est exprimé de manière ubiquitaire dans l'organisme (Penault-Llorca et al., 1998). La protéine BAX est préférentiellement sous forme globulaire inactive dans le cytosol des cellules saines selon le dogme actuel. Enfin, les souris *Bax*^{-/-} sont viables à la naissance (Knudson et al., 1995). Cependant, les souris présentent un défaut de croissance avec une pénétrance de 50%. Les souris mâles *Bax*^{-/-} sont stériles car un défaut d'apoptose perturbe profondément la spermatogénèse. De plus, les souris âgées présentent une hyperplasie des lymphocytes B et T montrant le rôle clé de BAX dans l'homéostasie lymphocytaire.

(ii) Bak - « BCL-2-antagonist Killer 1 »

BAK est aussi exprimé de manière ubiquitaire dans les tissus. Mais contrairement à BAX, BAK réside de manière constitutive à la membrane mitochondriale dans les cellules saines (Griffiths et al., 1999). Les souris *Bak*^{-/-} sont viables à la naissance et ne présentent pas de phénotype (Lindsten et al., 2000), (Hutcheson et al., 2005). La coopération entre BAX et BAK dans le contrôle de la voie intrinsèque de l'apoptose sera abordée aux **chapitre IV**.

(iii) Bok - « BCL2 related Ovarian Killer »

BOK a été identifié par un crible double hybride chez la levure à partir d'une banque d'ADN complémentaire d'ovaire de rat. Chez la levure, il a été montré par le système de double hybride que BOK interagit avec MCL-1, et BCL2A1 mais pas avec BCL-2, BCL-xL et BCL-w (Hsu et al., 1997a). Parmi les membres de la famille BCL-2, BOK montre la plus grande conservation au cours de l'évolution (Zhang et al., 2000). La protéine BOK a une grande similarité de séquence d'acides aminés avec BAX et BAK et partage avec ces protéines les domaines d'homologies BH1, 2 et 3 ainsi que le domaine transmembranaire C terminale. BOK est exprimée dans la plupart des tissus mais particulièrement dans les tissus reproducteurs femelles (Ke et al., 2012), (Hsu et al., 1997a). Au niveau cellulaire, BOK peut se localiser au niveau des mitochondries, du RE et dans le noyau des cellules (Gao et al., 2005), (Yakovlev et al., 2004), (Bartholomeusz et al., 2006). BOK possède une séquence riche en leucine indiquant un signal d'export nucléaire (NES) dans son domaine BH3 (Bartholomeusz et al., 2006). Une étude récente de *Echeverry N. et al.* propose un rôle majeur de BOK à la membrane du RE et du Golgi dans l'activation de la voie apoptotique intrinsèque de

manière dépendante de BAX et BAK. Les auteurs montrent que dans les fibroblastes embryonnaires de souris *Bax*^{-/-} *Bak*^{-/-}, BOK ne peut pas compenser la perte de BAX et BAK pour induire le MOMP et l'apoptose. Cependant la surexpression de BOK entraîne la fragmentation du RE et du Golgi. Cet effet est induit par le domaine transmembranaire C terminale de BOK qui sert de « queue d'ancrage » dans ces organelles cellulaires. Enfin, les MEF *Bok*^{-/-} répondent de manière anormale à la brefeldin A (BFA), une drogue qui bloque le transport des protéines du RE vers le Golgi entraînant un stress du RE. En réponse au stress du RE induit par la BFA les MEF *Bok*^{-/-} sont partiellement protégés de l'apoptose (Echeverry et al., 2013). Enfin, *BOK* a aussi été récemment identifié comme un potentiel gène suppresseur de tumeur. En effet, *Beroukhim et al.* ont localisé le gène *BOK* dans une région du génome qui est fréquemment délétée dans les cancers humains (Beroukhim et al., 2010). Les souris *Bok*^{-/-} se développent normalement et ne montrent pas d'anomalies à l'âge adulte (Ke et al., 2012).

(iv) Etude chez la souris de la compensation opportuniste entre les membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2

Il existe une compensation fonctionnelle entre *Bax* et *Bak* au cours de l'embryogenèse et dans l'homéostasie tissulaire chez la souris. En effet, les souris *Bax*^{-/-} ou *Bak*^{-/-} sont viables par contre la combinaison des deux perte de fonction (souris *Bax*^{-/-} et *Bak*^{-/-}) est létale au cours de l'embryogénèse suite à un défaut d'élimination de cellules en excès au cours des processus d'ontogénèse normaux (en particulier au niveau du système nerveux central (SNC)). Les rares souris *Bax*^{-/-} et *Bak*^{-/-} qui survivent (<10%) présentent une splénomégalie, une maladie des ganglions lymphatiques et une palmure interdigitale, des défauts de reproduction, du système nerveux, du système immunitaire et du comportement (Lindsten et al., 2000). En ce qui concerne *Bok*, les souris *Bok*^{-/-} *Bak*^{-/-} et *Bok*^{-/-} *Bax*^{-/-} ne montre pas d'anomalies. Cependant, les femelles âgées *Bok*^{-/-} *Bax*^{-/-} montrent une augmentation anormale du nombre d'ovocytes à des étapes différentes du développement, suggérant une fonction pro-apoptotique de BOK avec BAX dans l'atrésie folliculaire liée à l'âge (Ke et al., 2013).

c) Les membres pro-apoptotiques BH3 unique

Au cours de l'apoptose, la fonction principale des protéines à domaine BH3 unique est d'intégrer un stimulus apoptotique puis d'activer les protéines pro-apoptotiques à multi-domaines BAX et BAK directement ou indirectement en inhibant les membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2. Un modèle décrivant ces interactions complexes est présenté au **paragraphe IV**.

(i) Bad - « BCL2 associated agonist of cell Death » (BCL2-like 8, BCL2L8)

BAD a été la première molécule BH3-only à avoir été identifiée au cours d'un crible de double hybride chez la levure pour des partenaires de BCL-2 (Yang et al., 1995a). L'une des caractéristiques de BAD est la régulation de son activité pro-apoptotique en fonction de son état de phosphorylation sous le contrôle de la protéine kinase AKT en réponse à des facteurs de survie extracellulaires. BAD déphosphorylée va se lier et inactiver BCL-2 et BCL-xL au niveau de la mitochondrie. Sous sa forme phosphorylée en sérine (-112,-136 et -155), BAD est séquestrée dans le cytosol par sa liaison à la protéine chaperone 14-3-3 qui l'empêche de former des hétérodimères avec BCL-2 ou BCL-XL (Datta et al., 2000), (Zha et al., 1996). En plus, de son rôle dans l'apoptose et de sa régulation dynamique par phosphorylation, des études ont montré un rôle de BAD dans d'autres voies physiologiques comme le métabolisme du glucose et la transmission synaptique (Danial et al., 2008), (Jiao and Li, 2011). Ces fonctions non-apoptotiques de BAD seront développées dans **la partie V « Les fonctions non-apoptotiques de la famille BCL-2 »**. Dans les souris *Bad*^{-/-}, les lymphocytes se développent normalement sans hyperplasie précancéreuse, mais montrent de subtiles anomalies en termes de prolifération et de production d'IgG. Cependant, les souris *Bad*^{-/-} développent avec l'âge des lymphomes B à grandes cellules (Ranger et al., 2003).

(ii) Bim - « BCL2-like 11 » (BCL2L11)

Le criblage chez la levure de protéines se liant à la protéine BCL-2 a aussi permis la découverte de la protéine pro-apoptotique BIM (O'Connor et al., 1998). BIM est régulé au niveau transcriptionnel et post-traductionnel. Il existe trois isoformes de BIM résultant d'un épissage alternatif : BIM-S, la forme la plus courte (110 acides aminés), BIM-L (138 acides aminés) et BIM-EL (198 acides aminés) possèdent une partie N

terminale plus longue. Le niveau d'ARNm *BIM* est régulé positivement par le facteur de transcription FOXO3A sous déprivation de cytokines (Biswas and Greene, 2002) et par C/EBPa (CCAAT/enhancer binding protein) et CHOP (C/EBP homology protein) en cas de stress du RE. La fonction de BIM est aussi régulée par des modifications post-traductionnelles via la phosphorylation induite par ERK1/2 et β TrCP (beta-transducin repeat containing protein) qui va induire la dégradation des isoformes majeurs BIM via le protéasome (Dehan et al., 2009). De plus, il a été montré que BIM pouvait être régulé par son association avec le réseau de microtubule (Puthalakath et al., 1999). En effet, *Puthalakath et al.* ont montré que dans les cellules saines, BIM était séquestré par le moteur moléculaire à dynéine associé aux microtubules via son interaction avec la chaîne légère de dynéine cytoplasmique LC8. En réponse à un dommage à l'ADN (par irradiation γ) ou à une déprivation de facteur de croissance (IL-3), BIM est libérée de ce complexe et peut ainsi interagir, avec les autres protéines BCL-2 entraînant l'apoptose. Il a été montré que l'apoptose induite par la surexpression de BIM pouvait être inhibée par une co-surexpression de BCL-2 (O'Connor et al., 1998). BIM peut activer directement BAX pour induire l'apoptose (Marani et al., 2002). Les souris *Bim*^{-/-} sont défectueuses dans l'élimination des thymocytes réactifs et montrent une hyperplasie des cellules lymphoïdes et myéloïde, une splénomégalie, une maladie des ganglions lymphatiques et un lupus érythémateux systémique (Bouillet et al., 2002). La lumière des canaux mammaires chez la souris *Bim*^{-/-} se forme avec retard par rapport aux souris sauvages au cours de la puberté. Dans ce modèle, un processus de mort cellulaire non-apoptotique permet de compenser la perte de l'apoptose médiée par BIM mais avec un retard de plusieurs semaines (Mailleux et al., 2007).

(iii) Bid - « BH3 interacting domain death agonist »

Wang et al. identifient la protéine BH3 unique BID par clonage à partir d'une banque d'ADN complémentaire d'hybridome dérivé de lymphocyte T murin. BID peut s'hétérodimériser avec BAX et BCL-2. BID ne possède pas le signal d'ancrage C terminal et réside entre le cytosol et la membrane mitochondriale externe. BID à elle seule peut induire l'apoptose de manière dépendante de son domaine BH3 et de son interaction avec la poche hydrophobe de BAX (Wang et al., 1996). Deux ans plus tard, la forme tronquée de BID (tBID) est mise en évidence (Li et al., 1998), (Luo et al.,

1998). tBID est obtenue par le clivage de la forme entière de la protéine BID. Ce clivage est effectué par la caspase-8 après stimulation de la voie Fas. Ces observations mettent en évidence pour la première fois un lien direct entre les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose. Ainsi BID clivée va migrer à la mitochondrie pour activer BAX et/ou BAK (Desagher et al., 1999), (Eskes et al., 2000). Le clivage de BID peut s'effectuer aussi par d'autres protéases, dont la caspase-2 (en cas de choc thermique), le granzyme B (des lymphocytes cytotoxiques), la calpaïne (ischémie/reperfusion, cysplatine, ionomycone) et les cathepsines (Yin, 2006). La fonction pro-apoptotique de BID est aussi renforcée par l'ajout d'acide gras (N-myristoylation), qui favorise son ciblage vers la membrane externe mitochondriale (Zha et al., 2000). Les souris *Bid*^{-/-} se développent normalement, mais sont résistantes à la mort cellulaire induite par Fas dans le foie (Yin et al., 1999).

(iv) Puma - « BCL2 binding component 3 » (BBC3)

Puma est une protéine BH3 unique identifiée en 2001 par trois groupes. Deux groupes ont identifié *PUMA* comme une cible transcriptionnelle de P53 par criblage de gènes (Nakano and Vousden, 2001), (Yu et al., 2001), tandis que le troisième groupe a identifié PUMA comme un partenaire d'interaction avec la protéine BCL-2 (Han et al., 2001). Le gène *PUMA* est situé sur le bras long du chromosome 18, une région fréquemment délétée dans un grand nombre de cancers humains. Le contrôle de *PUMA* se fait principalement au niveau transcriptionnel. PUMA est normalement exprimée à un niveau basal très faible et est rapidement induite au cours de l'apoptose (Yu et al., 2001). PUMA est principalement localisée à la mitochondrie et peut induire l'apoptose des cellules en se liant directement avec les membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2, induisant ainsi la libération de BAX et BAK (Nakano and Vousden, 2001), (Yu et al., 2001). Les analyses structurales indiquent que le domaine BH3 de PUMA forme une structure en hélice- α amphipatique qui pourrait interagir directement avec les protéines anti-apoptotiques (Day et al., 2008). D'autres études de structures en cristallographie ont montré que le domaine BH3 de PUMA pouvait interagir avec l'hélice $\alpha 1$ de BAX entraînant l'activation de BAX (Cartron et al., 2004). Des modèles cellulaires dérivés des souris *Puma*^{-/-} sont résistantes à l'apoptose. Ainsi les fibroblastes *Puma*^{-/-} montrent une diminution de l'apoptose induite par des dommages à l'ADN. De

même les lymphocytes *Puma*^{-/-} sont protégés de l'apoptose induite par la déprivation en cytokine (Villunger et al., 2003).

(v) Bik - « BCL2-interacting killer »

En 1995, *Boyd et al.* découvrent BIK, le premier membre des protéines BH3 unique capable de se lier à BCL-2 et BCL-xL et d'induire l'apoptose. De plus, c'est la première fois que l'implication du domaine BH3 est mise en évidence dans la régulation de l'apoptose (Boyd et al., 1995). BIK est principalement localisée au niveau du RE (Germain et al., 2002). BIK semble induire l'apoptose suite à la libération du calcium du RE vers le cytosol. Cet influx de calcium va permettre l'activation et le recrutement de l'enzyme de fission mitochondriale DRP1 du cytosol vers la mitochondrie, ce qui entraîne la fragmentation des mitochondries (Germain et al., 2005). DRP1 est une GTPase cytosolique soluble qui entraîne la fragmentation de la membrane mitochondriale externe (Itoh et al., 2013). De plus, il a été montré dans les lignées de cancer pulmonaire H1299 que BIK pouvait coopérer avec des d'autres protéines BH3 unique qui ciblent la mitochondrie comme NOXA pour activer BAX de manière indépendante de l'activité enzymatique de DRP1, et induire ainsi l'apoptose. BIK est impliquée dans la sélection des lymphocytes B matures (Klein et al., 2003). En effet, par un criblage d'expression de gènes, la surexpression de *BIK* est observée au cours de la transition entre les cellules B naïves et les cellules B mémoires. Des analyses d'immunoblot de tissus humains montrent une expression élevée de BIK dans le rein et le pancréas, une faible expression dans le poumon et aucune expression détectable dans le côlon normale et les tissus lymphoïdes. En général, l'expression de BIK est augmentée dans les cellules cancéreuses humaines comme le lymphome de Burkitt (stade III) et les adénocarcinomes colorectaux (Daniel et al., 1999). BIK peut être régulée de manière post-traductionnelle par phosphorylation qui augmente son activité apoptotique. *BIK* est également sous le contrôle transcriptionnel du suppresseur de tumeur P53 et de la voie du TGF- β (Chinnadurai et al., 2008), (Spender et al., 2009).

(vi) Noxa - « phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 » (PMAIP1)

L'équipe de *Oda et al.* identifie en 2000 NOXA, un membre pro-apoptotique BH3 unique de la famille BCL-2 dont l'expression est induite par P53 en réponse à

l'irradiation aux rayons X dans des fibroblastes embryonnaires de souris (Oda et al., 2000). L'étude des souris *Noxa*^{-/-} montre une similarité fonctionnelle entre Noxa et Puma dans la réponse apoptotique induite par P53 (Villunger et al., 2003). Comme les souris *Puma*^{-/-}, les souris *Noxa*^{-/-} montrent une diminution de l'apoptose des fibroblastes induite par des dommages à l'ADN. En 2007 Nakajima et al. observent que NOXA et PUMA induisent en synergie l'activation de BAX et BAK pour induire l'apoptose (Nakajima and Tanaka, 2007).

(vii) Bmf - « BCL2 modifying factor »

La protéine à domaine BH3 unique, BMF découverte récemment par Puthalakath et al est fortement exprimée dans les cellules B et T immatures. Dans les cellules saines, BMF est séquestrée au niveau du cytosquelette d'actine par ses interactions avec les moteurs de type myosine V associés à la chaîne légère de dynéine 2. En réponse à un dommage à l'ADN ou à la perte d'attachement à la matrice extracellulaire (anoïkis) BMF est libérée de ce complexe et peut ainsi interagir, avec les autres protéines BCL-2 (Puthalakath et al., 2001). BMF est aussi sous le contrôle de la signalisation du TGF- β , et de différentes protéines kinases comme AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase) et JNK (Ramjaun et al., 2007), (Kilbride et al., 2010), (Tianhu et al., 2010), (Grespi et al., 2010). Par contre, l'activation des voies de signalisation et de survie ERK et AKT réprime la transcription de *Bmf*. BMF peut se lier à BCL-2, BCL-xL et BCL-w, et très faiblement à MCL-1 (Pinon et al., 2008). Des études récentes dans des MEFs transfectées avec des peptides BH3 correspondant à BMF suggèrent que BMF peut se lier directement à BAX et BAK (Du et al., 2011). Cependant, une étude récente montre que les protéines BH3 only, NOXA, BIK, BID et BMF activent indirectement BAX et BAK par des expériences de co-expression chez la levure (Gerecova et al., 2013).

(viii) Hrk/DP5 - « Harakiri BCL-2 interacting protein/ death protein 5 »

Hrk a été identifié dans les neurones sympathiques de rat par criblage de gènes induit par la déprivation en facteur de survie neuronal (NGF). L'absence de NGF induit ainsi l'expression de HRK dans les neurones sympathiques primaires et la surexpression transitoire de HRK conduit à leur mort par apoptose (Harris and Johnson, 2001),

(Imaizumi et al., 1997). HRK peut interagir avec les anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-xL (Imaizumi et al., 1997). L'expression de HRK est aussi détectée dans le pancréas humain (Inohara et al., 1997) où elle est surexprimée dans les cellules- β du pancréas apoptotiques en réponse à des cytokines pro-inflammatoires ($IL-1\beta$ + $IFN-\gamma$) et au stress du RE. Cette activation de HRK est aussi dépendante de la voie JNK/c-Jun dans ces cellules (Gurzov et al., 2009).

(ix) Compensation entre les différentes protéines à domaine BH3 unique : phénotypes combinés chez la souris

D'un point fonctionnel, seule la perte de certaines protéines à domaine BH3 unique peut compenser la perte de *Bax* et *Bak* chez la souris. En effet, les souris triple ko, *Bid*^{-/-} *Bim*^{-/-} *Puma*^{-/-} montrent le même phénotype que les souris double ko *Bax*^{-/-} *Bak*^{-/-}, dont une palmure interdigitale et une membrane vaginale non perforée (**figure 14**) (Ren et al., 2010), (Lindsten et al., 2000). Ceci démontre le rôle central de ces trois protéines à domaine BH3 unique (BID, BIM et PUMA) par rapport aux autres membres de la famille (BAD, PUMA, NOXA, HRK et BIK) dans le contrôle de l'activation de BAX et BAK au cours de la voie intrinsèque de l'apoptose (**voir tableau 1**).



Figure 14 : Comparaison des phénotypes des souris triple KO *Bim Bid Puma* et double KO *Bax Bak* au niveau de l'espace interdigital (A) et de l'ouverture du vagin (B).

Les souris triple KO *Bim*^{-/-} *Bid*^{-/-} *Puma*^{-/-} ont le même phénotype que les souris double KO *Bax*^{-/-} *Bak*^{-/-}. Les souris triple KO montrent une persistance des bandes de l'espace interdigital (A) et ne parviennent pas à développer une orrifice vaginale externe (B). Les flèches rouges indiquent la région vaginale externe. D'après (Ren et al., 2010), (Lindsten et al., 2000).

Tableau 1 : Récapitulatifs des phénotypes des souris invalidées pour les membres de la famille BCL-2.

Gène	Géno- type	Phénotype	Phénotype combinés	Références
Les protéines BCL-2 anti-apoptotiques				
<i>AI</i>	KO	Augmentation de l'apoptose spontanée des neutrophiles, absence d'inhibition de l'apoptose induite par LPS		(Hamasaki et al., 1998) (Orlowsky et al., 2002)
<i>Bcl-2</i>	KO	Augmentation de la mortalité post-natale, maladie polykystique rénale, involution apoptotique du thymus et de la rate, grisonnement des follicules pileux due à une augmentation d'apoptose, réduction du nombre de neurones, une petite taille	Double KO <i>Bcl-2</i> ^{-/-} et <i>Bim</i> ^{+/-} : plus de défaut de pigmentation du pelage Double KO <i>Bcl-2</i> ^{-/-} <i>Bim</i> ^{-/-} : le phénotype rénal n'est plus observé Double KO <i>Bcl-2</i> ^{-/-} <i>Bik</i> ^{-/-} : pas de phénotypes additionnels	(Cheng et al., 2001) (Coultas et al., 2004) (Veis et al., 1993) (Bouillet et al., 2001)
<i>Bcl-w</i>	KO	Mâles stériles dus à un défaut de spermatogenèse		(Print et al., 1998)
<i>Bcl-x</i>	KO	Létalité au niveau embryonnaire (jour E13.5) due à une apoptose massive des cellules hématopoïétiques et neurales		(Motoyama et al., 1995)
<i>Mcl-1</i>	KO	Létalité au niveau embryonnaire due à un défaut du blastocyste à s'implanter		(Rinkenberger et al., 2000)

Gène	Géno- type	Phénotype	Phénotype combinés	Références
Les effecteurs pro-apoptotiques				
<i>Bak</i>	KO	Aucun	Double KO <i>Bax</i> ^{-/-} <i>Bak</i> ^{-/-} : létalité embryonnaire (survie <10%) avec palmure interdigitale, défauts de l'appareil reproductif, du système nerveux, immunitaire, hématopoïétique Double KO <i>Bak</i> ^{-/-} <i>Bim</i> ^{-/-} : augmentation du nombre de lymphocytes	(Lindsten et al., 2000) (Hutcheson et al., 2005)
<i>Bax</i>	KO	Hyperplasie des cellules B et T, anormalité des cellules germinales et de la morphologie des gonades, espérance de vie prolongée des ovaires, mort cellulaire du SNC et SNP réduite	Double KO <i>Bax</i> ^{-/-} <i>Bim</i> ^{-/-} : palmure interdigitale, infertilité des mâles, augmentation du nombre de globules blancs	(Knudson et al., 1995) (Hutcheson et al., 2005) (Wei et al., 2001)
<i>Bok</i>	KO	Aucun	Double KO <i>Bak</i> ^{-/-} <i>Bax</i> ^{-/-} : les femelles âgées montrent une augmentation anormale du nombre d'ovocytes à des étapes différentes du développement	(Ke et al., 2013)

Gène	Géno- type	Phénotype	Phénotype combinés	Références
Les protéines BH3 unique				
<i>Bad</i>	Knockin (3S>3A)	La survie dépendante des facteurs de croissance est réduite dans les cellules immunitaires et nerveuses		(Datta et al., 2002)
	Knockin (S155A)	Sécrétion d'insuline anormale		(Danial et al., 2008)
	KO	Développent des lymphomes B à grandes cellules avec l'âge, développement normal des lymphocytes sans hyperplasie précancéreuse, mais subtiles anormalités au niveau de la prolifération et de la production d'IgG		(Ranger et al., 2003)
<i>Bid</i>	KO	Souris résistantes à l'apoptose induite par l'activation de FAS.	Double KO <i>Bid</i> ^{-/-} <i>Bim</i> ^{-/-} : pas de phénotypes additionnels	(Yin et al., 1999) (Willis et al., 2007)
<i>Bik</i>	KO	Aucun	Double KO <i>Bid</i> ^{-/-} <i>Bim</i> ^{-/-} : mâles infertiles dus à un arrêt de la spermatogenèse	(Coutlas et al., 2005)
<i>Bim</i>	KO	Accumulation de cellules lymphoïdes et myéloïdes, développements de maladies auto-immunes du Rein, les femelles montrent un vagin non-perforé. Retard dans la formation de la lumière des canaux mammaires.	Double KO <i>Bim</i> ^{-/-} <i>Noxa</i> ^{-/-} : Morphologie anormale des cellules NK Triple KO <i>Bim</i> ^{-/-} <i>Bid</i> ^{-/-} <i>Puma</i> ^{-/-} : phénocopie les souris double KO <i>Bax</i> ^{-/-} <i>Bak</i> ^{-/-}	(Bouillet et al., 1999) (Huntington et al., 2007) (Mailleux et al., 2007) (Ren et al., 2010)

<i>Bmf</i>	KO	Lymphocytes protégés de l'apoptose induite par les glucocorticoïdes ou les inhibiteurs d'histone désacétylase. Développement d'une adénopathie restreinte aux cellules B, augmentation de la fréquence de lymphomes thymiques induit par irradiation gamma. Protection contre la mort neuronale induite par des convulsions (crises épileptiques).	(Labi et al., 2008) (Moran et al., 2013)
<i>Bnip3</i> <i>L/nix</i>	KO	Morphologie anormale, absence d'élimination des mitochondries, diminution du nombre et augmentation de la fragilité des réticulocytes et des érythrocytes	(Diwan et al., 2007) (Schweers et al., 2007)
<i>Hrk</i>	KO	Les motoneurones sont protégés de la mort cellulaire induite par la résection du nerf hypoglosse, mort cellulaire retardée des neurones des ganglions cervicaux supérieurs induite par absence de NGF	(Imaizumi et al., 2004) (Coulas et al., 2007)
<i>Noxa</i>	KO	Léger défaut de résistance à l'étoposide des MEFs et thymocytes	(Villunger et al., 2003)
<i>Puma</i>	KO	Lymphocytes protégés de l'apoptose, thymocytes, neurones et MEFs résistants à l'apoptose induite par des dommages à l'ADN	(Villunger et al., 2003) (Jeffers et al., 2003)

IV. LA PROTEINE BAX DANS L' APOPTOSE

1) *Découverte et conservation au sein des espèces de Bax*

BAX (BCL-2- Associated X protein) a été le premier membre pro-apoptotique de la famille BCL-2 à être identifié en 1993 (Oltvai et al., 1993) et il fut rapidement évident que le ratio entre BAX et l'anti-apoptotique BCL-2 était un mécanisme moléculaire fondamental de la balance entre la survie et l'apoptose cellulaire (Korsmeyer et al., 1993).

Le gène *BAX* est principalement présent chez les mammifères. Il est conservé chez le chimpanzé, le singe rhésus, le chien, la vache, la souris, le rat et le poisson zèbre. Il n'existe pas d'orthologue de BAX et des autres membres de la famille BCL-2 chez la levure (une protéine de type caspase est par contre présente). Cependant l'expression de BAX chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* entraîne un phénotype léthal présentant les caractéristiques morphologiques de l'apoptose. Dans ce modèle simple, BAX est directement adressé à la mitochondrie et induit la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. De plus, cet effet est bloqué par une co-expression de Bcl-2 (Sato et al., 1994).

Chez l'homme, le gène codant pour Bax (4.5kb) se situe sur le chromosome 19 en position 19q13.3-q13.4 et contient six exons. Il existe plusieurs variants d'ARNm de *Bax* décrits dans la littérature ou référencés dans les bases de données (Gene and Nucleotide NCBI databases) : BAX- α , BAX- β , BAX- δ , BAX- γ , BAX- ϵ , BAX- ζ , BAX- σ , BAX- ψ et BAX- ω (**figure 15**).

2) *Structure des différentes isoformes de BAX*

Parmi ces neuf isoformes, seules BAX- α (Oltvai et al., 1993), BAX- β (Fu et al., 2009), BAX- σ (Schmitt et al., 2000), BAX- ψ (Jin et al., 2001), BAX- ω (Zhou et al., 1998) et BAX- ϵ (Shi et al., 1999) semblent jouer un rôle direct dans l'apoptose. En ce qui concerne les autres isoformes, des données convaincantes démontrant soit leur existence au niveau protéique (BAX- γ , BAX- ϵ), soit une activité pro-apoptotique (BAX- δ) sont manquantes.

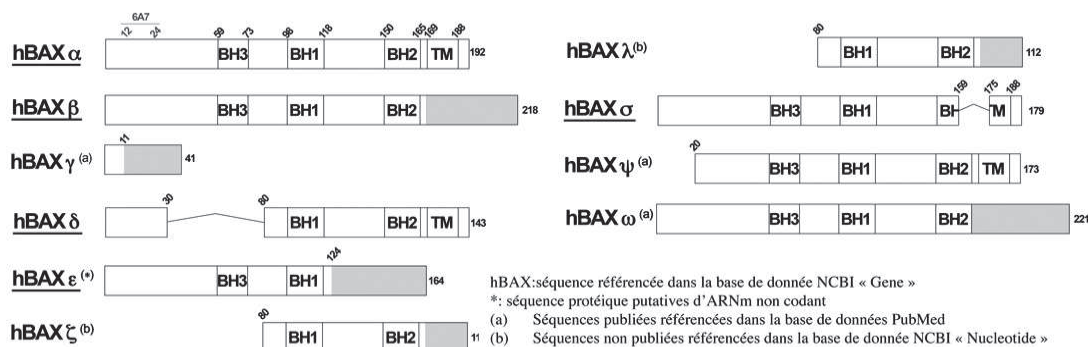


Figure 15 : Illustration des isoformes de la protéine humaine BAX.

Les domaines de la protéine BAX-α sont indiqués en haut, (BH: domaines d'homologie à BCL-2, TM: domaine transmembranaire). Les boîtes grises représentent les séquences protéiques non conservées. Le nombre d'acides aminés de la protéine est noté sur la droite.

BAX-α est une protéine de 21kDa (192 résidus amino acides) qui possède trois domaines d'homologie à BCL-2 nommés domaines BH (BCL-2 homology) conservé, BH1, BH2, BH3 et un domaine transmembranaire (Oltvai et al., 1993). BAX-α est l'isoforme de BAX la plus étudiée et la mieux caractérisée à l'heure actuelle.

BAX-β est une protéine pro-apoptotique de 24kDa (218 acides aminés) qui est présente de manière ubiquitaire mais a un faible niveau. Il a été montré dans des cellules de cancer colorectal HCT116 humaines que BAX-β peut s'associer avec BAX-α et induire son activation (changement de conformation). BAX-β possède une séquence C terminale différente de BAX-α qui permet de réguler par un processus post-traductionnelle l'expression de BAX-β. En effet, cette partie C terminale spécifique de BAX-β peut être poly-ubiquitinylée, permettant le ciblage et la dégradation de la protéine par le protéasome (Fu et al., 2009). Cet isoforme est aussi présente dans le cerveau, le poumon, le foie, le rein, et le cœur de rat (Zhou et al., 1998).

BAX-δ est une isoforme de 16 kDa (143 acides aminés). En comparaison avec BAX-α, BAX-δ possède le domaine d'ancrage C terminale, les domaines BH1 et BH2, mais ne possède pas de domaine BH3 (exon 3) (Apte et al., 1995). BAX-δ a aussi été identifié comme un nouvel antigène tumoral dans la leucémie aigüe lymphoblastique (Maia et al., 2005).

BAX-ψ, identifié dans une librairie d'ADN complémentaire de cerveau de rat ischémique, BAX-ψ est une isoforme pro-apoptotique pouvant induire la mort neuronale. Ce variant de BAX code pour est une protéine de 19kDa (173 acides aminés)

qui possède les domaines BH1, BH2 et BH3 et le domaine C terminale transmembranaire, mais qui possède aussi un insert supplémentaire de 446 paires de bases entre les exons 1 et 2 qui entraîne la perte du domaine ART (apoptosis regulation of targeting) N terminal (voir paragraphe « Extrémité N terminale : motifs d'adressage à la mitochondrie (Jin et al., 2001).

BAX- ω est une protéine de 24kDa (221 acides aminés) exprimée dans le cerveau humain, le cerveau, le poumon, le foie, le rein, et le cœur de rat. Cette isoforme possède un insert supplémentaire entre les exons 5 et 6 et donc ne possède pas le domaine TM. Une surexpression transitoire de BAX- ω potentialise la mort cellulaire à un niveau comparable d'une surexpression de BAX- α dans les cellules rénales de singe E5. Par contre, les lignées de fibroblastes de souris L929 transfectées de manière stable avec BAX- ω sont plus résistantes à l'apoptose (Zhou et al., 1998).

BAX- ϵ est une protéine de 18kDa (164 acides aminés) exprimée dans le cerveau humain, le cœur, le rein et les ovaires de souris et qui ne possède pas les 69 derniers acides aminés de BAX- α comprenant les domaines BH2 et TM. Une surexpression de BAX- ϵ induit l'apoptose cellulaire qui peut être abrogée par une co-surexpression de Bcl-2 ou Bcl-XL (Shi et al., 1999).

BAX- σ a été identifié et cloné à partir de cellules promyélocitaires de cancer humain. Par rapport à l'isoforme BAX- α , BAX- σ comprend les domaines BH1, BH2, BH3, le domaine TM mais n'a pas les acides aminés de 159 à 171. Dans les cellules humaines, la sur-expression de BAX- σ exerce des effets similaires à celle de BAX- α en augmentant l'apoptose induite par différents agents génotoxiques (Schmitt et al., 2000).

3) Régulations des fonctions apoptotiques de BAX

Nous avons évoqué à plusieurs reprises au cours des paragraphes précédents le rôle clé de BAX dans la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie, acte aux conséquences mortelles pour la cellule. Parmi toutes les isoformes de BAX décrites dans le paragraphe précédent, la quasi-totalité de la régulation de la voie intrinsèque de l'apoptose par BAX concerne l'isoforme BAX- α . De plus il est difficile de dissocier BAX et BAK dans la régulation de la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie car ces deux protéines peuvent se compenser mutuellement

de manière opportuniste du point de vue fonctionnelle (**voir description au paragraphe b) (iv) Phénotypes combinés chez la souris page**) des souris simplement invalidées pour *Bax* ou *Bak* comparées aux souris *Bax*^{-/-} *Bak*^{-/-}).

a) Les différents domaines de BAX nécessaire à son adressage à la mitochondrie

Selon les données actuelles de la littérature, la protéine BAX est majoritairement localisée sous forme globulaire inactive dans le cytoplasme des cellules saines alors que BAK est déjà présent à la mitochondrie. Sous l'initiation d'un signal apoptotique, les protéines BAX vont se relocaliser du cytoplasme vers la membrane mitochondriale (Hsu et al., 1997b), (Wolter et al., 1997). Suite à ce signal apoptotique les protéines BAX subissent un changement de conformation et s'insèrent dans la membrane externe mitochondriale entraînant les conséquences maintes fois évoquées précédemment.

En 1998, *Goping et al.* mettent en évidence le changement de conformation entre les formes cytosoliques et mitochondriales de BAX (Goping et al., 1998). Les auteurs mettent en évidence que le domaine NH2-terminal de BAX est impliqué dans la régulation de BAX ciblant la mitochondrie et nomment ce domaine N terminal ART pour « apoptosis regulation of targeting ». In vitro, la délétion du domaine ART (les 19 premiers acides aminés en N terminal) entraîne une rapide association de BAX avec la mitochondrie et la mort cellulaire. *Cartron et al.* ont identifié par mutagenèse dirigée le rôle crucial de la proline en position 13 du domaine ART de BAX- α pour maintenir la protéine dans sa conformation cytosolique inactive (Cartron et al., 2002). Comme les protéines anti-apoptotiques BCL-2, BAX comprend 9 hélices alpha (**figure 16**) (Suzuki et al., 2000).

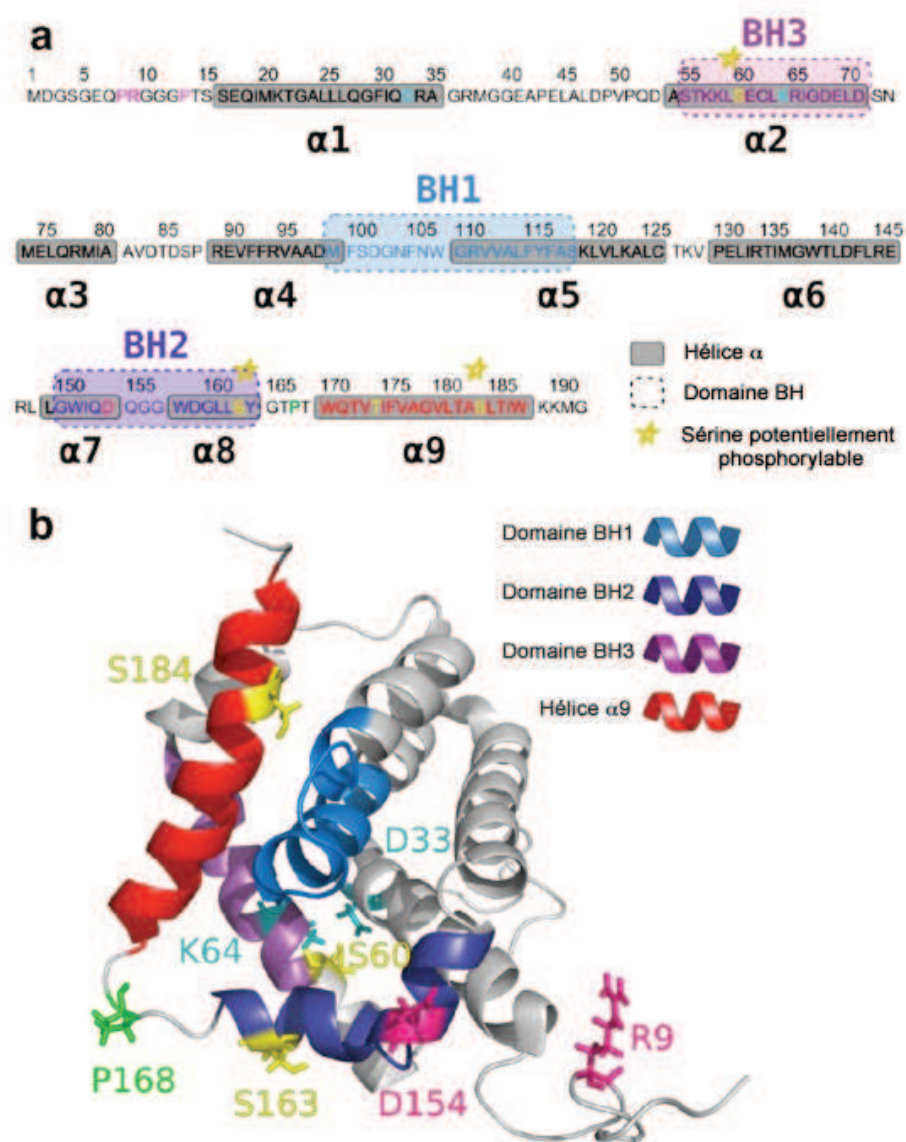


Figure 16 : Structure primaire (a) et tertiaire (b) de BAX humain.
D'après (Renault and Manon, 2011).

Parmi les neuf hélices α de BAX, 7 hélices amphipathiques sont regroupées autour de 2 hélices centrales hydrophobes. La structure tridimensionnelle de BAX a permis de mettre en évidence le changement de conformation du N terminal entraînant l'exposition du domaine ART et de l'hélice $\alpha 1$. L'hélice $\alpha 1$ se trouve entre le 16^{ième} et le 35^{ième} acide aminé de la partie N terminale (Suzuki et al., 2000). De plus, il a été montré chez les mammifères et la levure l'implication de l'hélice $\alpha 1$ dans l'adressage de BAX à la mitochondrie par délétion de l'hélice $\alpha 1$ (Cartron et al., 2003). Le changement de conformation de la partie N terminale de BAX est un indice de l'activation de BAX.

L'anticorps monoclonal 6A7 dirigé contre les 19 premiers acides aminés de la partie N terminal comprenant l'ART et l'hélice $\alpha 1$. Cet anticorps reconnaît la partie N terminale de BAX quand celui-ci subit un changement de conformation en position ouverte (Peyerl et al., 2007). L'interaction de l'hélice $\alpha 1$ de BAX avec BID ou PUMA a été mis en évidence par une approche de résonance plasmodique de surface (Cartron et al., 2004). De plus, il a été mis en évidence par spectroscopie RMN (spectre de résonance magnétique nucléaire) que l'hélice $\alpha 1$ (domaine BH4) de BAX interagissait avec le domaine BH3 de BIM (Gavathiotis et al., 2008). L'hélice- $\alpha 2$ du domaine BH3 de BAX est requise pour son homo-oligomérisation (Wang et al., 1998). La délétion de segments BAX suggère que seules les hélices- $\alpha 2$ et - $\alpha 5$ sont capables de s'oligomériser. Ce domaine BH3 est aussi impliqué dans les interactions avec les membres anti-apoptotiques de la famille et les protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 unique (Ku et al., 2011).

Les protéines BAX et BAK sont dirigées vers la membrane externe mitochondriale par ancrage de leur queue en position carboxyl terminale (TA pour tail anchor) (Youle and Strasser, 2008). La queue d'ancrage de BAX comprend l'hélice- $\alpha 9$. Il a été mis en évidence que l'hélice- $\alpha 9$ de BAX était suffisante pour permettre la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (George et al., 2007). Cependant, il existe un équilibre constant entre les formes cytosolique et mitochondriale de BAX. En effet, BAX peut retourner de la mitochondrie vers le cytosol par son interaction avec les protéines anti-apoptotiques comme BCL-xL présente à la mitochondrie de manière constitutive (Edlich et al., 2011).

b) Les différents modèles d'activation de BAX

Les modèles de régulation de l'activation de BAX au cours de l'apoptose ont évolué au fur et à mesure de la découverte des autres membres de la famille BCL-2 et de la complexité de leurs interactions. Dans ce paragraphe, nous allons présenter ces modèles de manière chronologique.

(i) Le modèle de la balance apoptotique BAX / BCL-2 (1995)

Dans un premier modèle (1995), l'apoptose était régulée par la balance entre les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (BCL-2, BCL-XL, BCL-w) et les protéines pro-apoptotiques (BAX et BAK) (Adams and Cory, 2007a). En présence d'un excès de facteurs pro-apoptotiques par rapport aux protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2, la cellule entrait en apoptose (**Figure 17**).

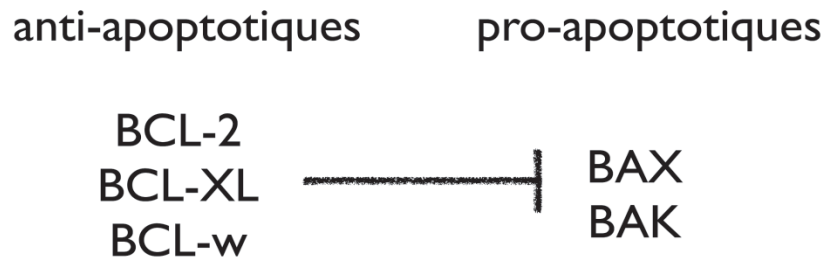


Figure 17: Modèle de la balance apoptotique.

Cependant, l'identification des protéines à domaine BH3 unique (BH3-only) en 2002 a montré que ce modèle était obsolète. En effet, le simple ratio entre les protéines BAX/BCL-2 ne permettait pas de prédire le devenir de la cellule.

(ii) Le modèle d'activation faisant intervenir les protéines apoptotiques à domaine BH3 unique comme inhibiteurs généraux des anti-apoptotiques (2002)

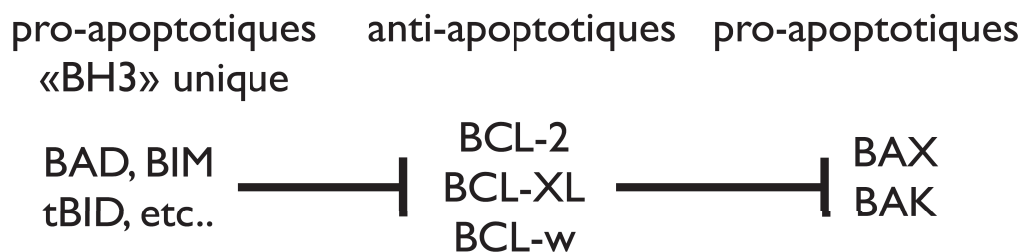


Figure 18 : Les modèles d'activation faisant intervenir les protéines apoptotiques à domaine BH3 unique.

Suite à l'identification des protéines à domaine BH3 unique ou « BH3-only », un nouveau modèle de régulation de l'activation de BAX a été proposé (**Figure 18**). En condition normale, les protéines « BH3-only » sont inactives et existent à un niveau faible dans la cellule. Suite à divers stimuli apoptotiques, les niveaux d'expression des protéines « BH3-only » vont être augmentés de manière transcriptionnel et/ou post-traductionnel pour induire l'apoptose en inhibant les facteurs anti-apoptotiques. Dans ce modèle, les différentes protéines BH3-only comme BAD, BIM, tBID vont interagir avec les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 tel que BCL-2, BCL-xL et BCL-w qui interagissent et bloquent l'activation de BAX et BAK à la mitochondrie. Les protéines à domaine « BH3 unique » permettaient de lever l'inhibition des anti-apoptotiques sur BAX et BAK, menant à l'apoptose de la cellule (Adams and Cory, 2007a).

De plus, l'activité des protéines « BH3-only » peut être aussi bloquée par les membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 comme BCL-2, BCL-w, MCL-1, A1 et BCL-B. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'inhibition de l'apoptose par les anti-apoptotiques BCL-2. Ces protéines anti-apoptotiques sont soit liées aux protéines BAX et BAK pour empêcher leur oligomérisation ou sont neutralisées par liaison directe avec les protéines « BH3-only » (Llambi et al., 2011). De plus, certains membres anti-apoptotiques comme BCL-xL peuvent se relocaliser et s'insérer dans la membrane externe mitochondriale sous stimulation apoptotique (Edlich et al., 2011), (Hsu et al., 1997b). Dans ce modèle, les protéines BCL-2 anti-apoptotiques inhibent le MOMP par une interaction directe avec les membres pro-apoptotiques (Hsu et al., 1997b), (Dlugosz et al., 2006). Un autre modèle a été proposé par l'équipe d'Edlich *F et al.* où en condition normale BAX est constamment relocalisé de la mitochondrie vers le cytosol via un mécanisme dépendant de son interaction avec BCL-xL (Edlich et al., 2011).

(iii) Les modèles d'activation où les protéines apoptotiques à domaine BH3 unique agissent comme des inhibiteurs sélectifs des anti-apoptotiques et/ou des activateurs directs de BAX et BAK (2007 - 2013)

Dans le modèle précédent, les protéines à domaine BH3 unique activaient BAX de manière indirecte en inhibant les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2. Cependant, différentes équipes montrèrent que le changement de conformation de la protéine BAX en position ouverte pouvait être initié directement par interaction avec certaines protéines « BH3-only » via leur domaine BH3. Cependant ce modèle fait encore débat.

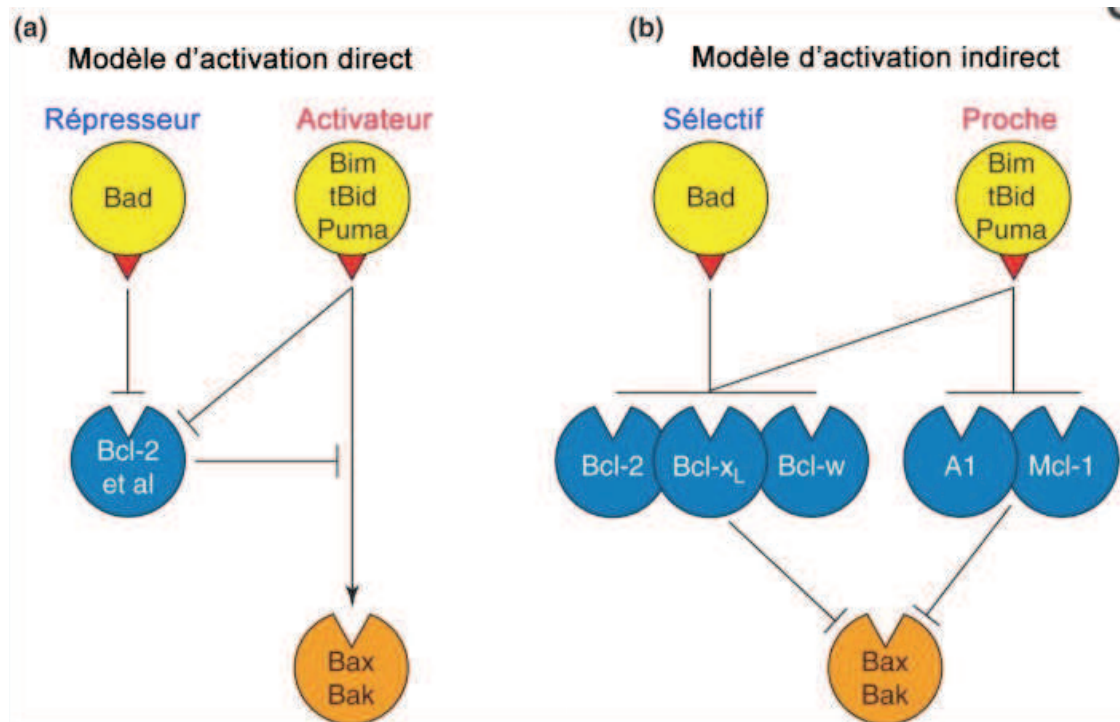


Figure 19 : Les modèles d'activation où les protéines apoptotiques à domaine BH3 unique agissent comme des inhibiteurs sélectifs des anti-apoptotiques et/ou des activateurs directs de BAX et BAK. D'après (Adams and Cory, 2007b).

Dans un premier modèle qui est assez semblable au précédent, l'activation de BAX et de BAK est indirecte via l'inhibition des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 par les protéines à domaine « BH3 unique ». Cependant, il a été mis en évidence que l'affinité des différentes protéines « BH3 unique » pour les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 était variable. Par exemple, BAD se lie préférentiellement à BCL-2, BCL-XL et BCL-W. De même, NOXA n'interagirait qu'avec MCL-1 et A1. Par contre BIM, BID tronqué et PUMA peuvent se lier à l'ensemble des protéines anti-apoptotique. La réponse apoptotique serait la conséquence

de la combinaison des protéines « BH3 unique » exprimées par la cellule et de la neutralisation sélective des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 par ces protéines. Ainsi dans une cellule exprimant BCL-2, BCL-XL, BCL-w, A1 et MCL1, l'expression de BAD seule ne serait pas suffisante pour induire l'apoptose. Mais l'expression de BIM seule ou la combinaison de BAD avec NOXA pourra tuer la cellule car l'ensemble des protéines anti-apoptotiques exprimées serait alors inhibé (**voir figure 19**).

Dans un deuxième modèle, Les protéines BH3-only sont classées en deux groupes : les « dérépresseurs » comme NOXA, BIK, BMF, BAD qui inhibent les membres anti-apoptotiques et les « activateurs directes » comme Bid, Bim et Puma qui peuvent activer directement BAX et BAK en plus d'inhiber les protéines anti-apoptotiques (Du et al., 2011). Le rôle des « dérépresseurs » serait alors de libérer les « activateurs directes » des protéines anti-apoptotiques pour leur permettre d'activer BAX et BAK.

Ces deux modèles sont encore débattus à l'heure actuelle. Cependant, il faut noter que les protéines à domaine « BH3 unique » BIM, BID et PUMA jouent un rôle central dans ces deux modèles. L'étude in vivo des souris triple invalidées *Bim*^{-/-} *Bid*^{-/-} et *Puma*^{-/-} a bien confirmé le rôle essentiel de BIM, BID et PUMA dans l'activation de BAX et BAK (Ren et al., 2010). Comme mentionné précédemment, ces souris triplement invalidées montrent les mêmes défauts de développement que les souris double ko *Bax*^{-/-} *Bak*^{-/-}.

De plus, il a été montré très récemment que les protéines « BH3-only » pouvaient activer de manière préférentielle BAX ou BAK. En effet, *Sarosiek et al.* ont montré par l'utilisation de peptides correspondant au domaine « BH3 only » que tBID active préférentiellement BAK tandis que BIM active préférentiellement BAX dans les cellules humaines (Hela) et murines (MEFs, cellules épithéliales de rein de souris) (Sarosiek et al., 2013).

Cette année, l'équipe de *Schellenberg et al.* propose aussi un modèle où deux populations de protéines BAX co-existeraient à la mitochondrie : une fraction dynamique en équilibre entre le cytosol et la mitochondrie et une fraction de BAX plus stable et inhibée par BCL-xL à la membrane mitochondriale. L'inhibition des signaux de survie augmenterait la fraction mitochondriale de BAX en excès par rapport à BCL-xL. Les auteurs suggèrent que BAK fournisse une base de référence de la fonction des

protéines pro-apoptotique à multi-domaine à la mitochondrie (car présente de manière constitutive à la surface de cet organe) tandis que BAX permettrait aux cellules d'ajuster leur sensibilité à l'apoptose en titrant la quantité de BAX présente à la membrane externe mitochondriale (Schellenberg et al.).

c) Oligomérisation de BAX par les protéines BH3-only

Comme mentionné précédemment, la protéine BAX existe au moins sous deux conformations stables (Suzuki et al., 2000), (Moldoveanu et al., 2006). D'un côté, elles sont organisées en structures stables globulaires et d'un autre côté, elles adoptent une conformation d'insertion à la membrane (Annis et al., 2005), (Llambi et al., 2011). Les modalités d'insertion et d'induction du MOMP par BAX au cours de l'apoptose ne sont pas encore bien définies.

La première étape suite à son activation est la formation d'oligomères de BAX à la membrane externe de la mitochondrie.

(i) Formation de pore par BAX à la mitochondrie

Récemment, grâce à l'étude par cristallographie, l'équipe de Czabotar *et al.* propose un modèle d'activation et d'oligomérisation de BAX par les protéines pro-apoptotiques BH3-only (**Figure 20 et 21**) (Czabotar et al., 2013).

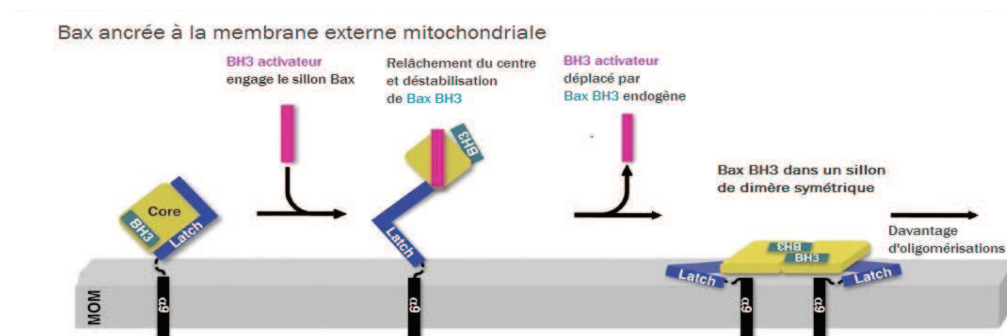


Figure 20: Modèle d'ancrage de BAX à la membrane externe mitochondriale.

Lors d'un stimulus apoptotique, le domaine BH3 activateur se lie au sillon et déverrouille la structure, relâchant le domaine BH3 de BAX et permettant qu'il rentre en compétition avec le sillon des molécules BAX voisines à la membrane externe mitochondriale. Le complexe final, le dimère symétrique du sillon BH3 de BAX est favorisé grâce à la stabilité offerte par dimérisation. Dans ce dimère, les positions du domaine verrouillé et l'ancrage de l'hélice- $\alpha 9$ à la membrane n'est pas connue. Les surfaces $\alpha 4$ - $\alpha 5$ des

dimères lipophiles peuvent engager la membrane mitochondriale externe et induire sa perméabilisation. D'après (Czabotar et al., 2013).

Ce modèle proposé par Czabotar et al. supporte le modèle d'activation directe de BAX par les protéines « BH3-only ». Dans ce modèle, la protéine activatrice « BH3-only » va insérer son domaine BH3 dans le sillon central de BAX en conformation globulaire, initiant le relâchement du domaine central ($\alpha 1$ - $\alpha 5$), du domaine verrouillé ($\alpha 6$ - $\alpha 8$) et le délogement de l'hélice $\alpha 2$ de BAX (son domaine BH3). Le domaine BH3 libéré par les protéines activatrices « BH3-only » peut alors interagir avec le sillon d'une autre molécule BAX et former un dimère stable. Ce dimère stable va pouvoir former des pores à la membrane externe mitochondriale menant à sa perméabilisation. Lors d'un stimulus apoptotique, de la même manière que BAX, BAK peut s'oligomériser et perméabiliser la membrane mitochondriale externe.

Suite à son oligomérisation, BAX peut former de larges pores dans la membrane externe mitochondriale qui vont être responsable du relâchement des facteurs apoptotiques. Différentes études montrent que la protéine BAX contient tous les motifs nécessaires pour la formation des pores de manière autonome. Par exemple, les fragments correspondant aux hélices- $\alpha 5$ - $\alpha 6$ de BAX montrent une activité similaire sur la formation des pores que la protéine entière (Garcia-Saez et al., 2005), (Garcia-Saez et al., 2006). D'autres études suggèrent que BAX peut former des pores toroïdales et lipidiques. Dans ce modèle, les hélices- $\alpha 5$ - $\alpha 6$ de BAX et BAK sont insérés dans la membrane et sont impliqués dans la formation des pores et l'hélice- $\alpha 9$ est aussi insérée dans la membrane (Westphal et al.). Certains lipides mitochondriaux comme la cardiolipine pourraient aussi être impliqués dans l'oligomérisation de BAX et à la formation de pores assez larges pour relâcher le cytochrome c (Terrones et al., 2004), (Lucken-Ardjomande et al., 2008). Cependant, ce rôle serait accessoire car il a été montré que BAX était capable de s'oligomériser et d'induire le relâchement du cytochrome c de mitochondries déficientes en cardiolipine (Gonzalvez et al., 2008).

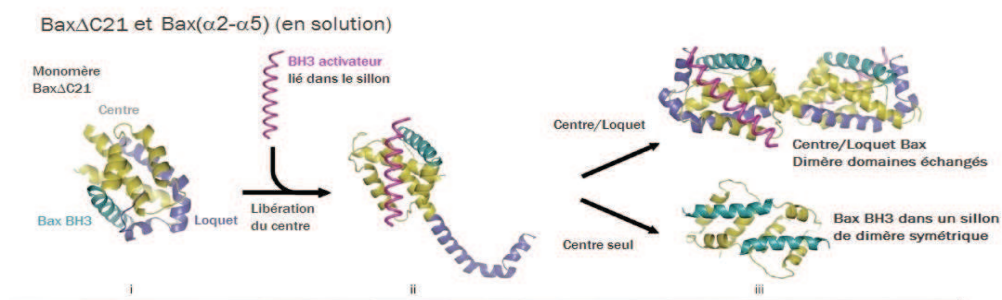


Figure 21 : Modèle démontrant l'activation de BAXΔC21, la dimérisation de BAX (α2-α5).

(A) (i) BaxΔC21 est monomérique en absence de détergents ou de CHAPS plus des peptides BH3 (ii) La liaison du peptide BH3 activateur dans le sillon canonique de BAX ouvre le domaine central (α1-α5) (iii) En l'absence d'attachement orienté de la membrane, deux molécules combinées se déverrouillent (« tête-à-queue ») pour former le dimère centre/verrou. On note le changement dans l'orientation du centre dans cette figure une fois que le verrou est libéré (i à ii). Le centre seul à la place forme un dimère symétrique dans le sillon BH3. D'après (Czabotar *et al.*, 2013).

d) Régulation de l'activation et de l'insertion de BAK

Lors d'un stimulus apoptotique, de la même manière que BAX, BAK peut s'oligomériser et perméabiliser la membrane mitochondriale externe.

e) Implication de BAX dans d'autres événements clé de l'apoptose

Au décours de l'apoptose, les protéines BAX ainsi que les protéines BAK sont impliquées dans d'autres processus que la formation de pore à la surface de la mitochondrie

(i) Activation des canaux anioniques voltage dépendant de la mitochondrie (VDAC)

Les canaux anioniques voltage dépendant de la mitochondrie (VDAC) est la voie principale de perméabilité pour les métabolites dans la membrane externe mitochondriale. Narita *et al.* ont mis en évidence l'interaction de BAX et de BAK avec les canaux VDAC par co-immunoprécipitation (Narita *et al.*, 1998). Cette étude suggère que ces deux protéines pro-apoptotiques interagissent avec les canaux VDAC pour induire leur ouverture et ainsi participer à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale au cours de l'apoptose. Cependant ce rôle reste encore controversé à l'heure actuel (Shore, 2009).

(ii) Activation de l'apoptose au niveau du réticulum endoplasmique par BAX

Zong et al. mettent en évidence la localisation des protéines BAX et BAK au niveau du réticulum endoplasmique (RE) où elles peuvent initier l'apoptose. En effet, dans les MEF *bax*^{-/-} *bak*^{-/-}, la surexpression de mutants *Bak* ciblant spécifiquement le RE induit un relargage du calcium contenu dans le RE vers le cytosol qui va induire le clivage et l'activation de la caspase-12 menant les cellules à l'apoptose (Zong et al., 2003). De plus, ces auteurs mettent en évidence un changement de conformation de BAX puis d'oligomérisation au niveau du RE en réponse à un stress du RE.

(iii) Implication de BAX dans la redistribution de protéines entre les différents compartiments cellulaires au cours de l'apoptose

Récemment, il a été montré que les protéines BAX et BAK étaient impliquées dans la redistribution des protéines nucléaires au cours de l'apoptose (Lindenboim et al., 2010). En effet, suite à différents stimuli apoptotiques, certaines protéines nucléaires telles que l'histone H1 et la nucléophosmine sont redistribuées vers le cytoplasme avant même l'apparition de signes morphologiques d'apoptose. L'utilisation de MEF *Bax*^{-/-} *Bak*^{-/-} a permis de mettre en évidence que cette redistribution nucléaire/cytoplasmique était uniquement dépendante de BAX et BAK. Cette redistribution n'est pas accompagnée d'une exposition du domaine N terminal de BAX et n'était pas inhibée par BCL-xL. Cette étude, identifie pour la première fois une fonction apoptotique de BAX et BAK qui n'est pas en relation avec l'activité de formation de pores à la mitochondrie.

f) Régulation de l'activité de BAX par des non-membres de la famille BCL-2

De nombreux éléments dans la littérature montre que l'activation de BAX peut être médiée par des polypeptides autres que les protéines de la famille BCL-2. Ceci a pour

conséquence d'augmenter le degré de complexité de la régulation de l'activation de BAX et de l'apoptose.

(i) Les partenaires activateurs de BAX impliqués dans la régulation de l'apoptose

1) *Interaction avec P53 dans le cytosol*

L'activation de l'apoptose par P53 peut se faire aussi de manière indépendante de sa fonction transcriptionnelle. En effet, même si la plupart des protéines P53 restent dans le noyau, une partie peut être relocalisée à la mitochondrie où elles peuvent induire l'apoptose de manière indépendante de leur activité transcriptionnelle (Ahn et al., 2010). A la mitochondrie, P53 peut interagir avec les protéines anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-XL entraînant la libération de la protéine pro-apoptotique BAX. P53 peut aussi interagir directement avec BAX et BAK et entraîner leur activation (Mihara et al., 2003), (Chipuk et al., 2004), (Leu et al., 2004), (Tomita et al., 2006).

2) *Interaction avec Nucléophosmine*

Il a été identifié par spectrométrie de masse après chromatographie d'affinité que BAX interagissait avec la protéine chaperonne Nucléophosmine (NPM) dans les lignées cellulaires humaines SH-SY5Y (Kerr et al., 2007). Cette interaction a été confirmée par immunoprécipitation dans ces mêmes cellules. La microscopie confocale a permis de mettre en évidence que la translocation de Nucléophosmine du noyau vers le cytosol potentialiserait le recrutement de BAX à la mitochondrie pour induire l'apoptose cellulaire en réponse à la staurosporine. De manière intéressante, l'inhibition de l'expression de la Nucléophosmine par ARNi diminue l'apoptose. De plus, les auteurs ont montré que la nucléophosmine se relocalisait dans un modèle d'AVC chez la souris ischémique. Comme mentionnée dans le paragraphe (ii), la relocalisation de la nucléophosmine serait sous le contrôle direct de BAX au début du processus d'apoptose (Lindenboim et al., 2010). Ainsi BAX favoriserait la relocalisation de la NPM pour amplifier sa propre activité apoptotique dans une boucle d'amplification positive.

Ces études identifient un nouveau mécanisme moléculaire d'activation de BAX à la mitochondrie pour induire la mort cellulaire.

3) *Interaction avec la protéine ASC « apoptosis-associated speck-like »*

La protéine ASC est une protéine adaptatrice qui possède un domaine de mort Pyrin/PAAD et un domaine d'interaction protéine-protéine CARD. *Ohtsuka et al.* ont mis en évidence que la protéine ASC pouvait fonctionner comme une molécule adaptatrice pour BAX et réguler la voie mitochondriale de l'apoptose P53-BAX décrite plus haut (Ohtsuka et al., 2004).

4) *Activation par les calpaïnes*

Les calpaïnes peuvent cliver in vitro la protéine BAX (21kDa) après la glutamine 28 pour générer un fragment tronqué de BAX (nommé t-BAX) de 18kDa (Toyota et al., 2003). L'activité apoptotique de cette forme tronquée de BAX est plus forte que la forme entière de BAX. En effet, l'activité pro-apoptotique de tBAX n'est pas inhibée par l'anti-apoptotique BCL-xL in vitro.

(ii) Les partenaires inhibiteurs de BAX dans le contrôle de l'apoptose

Plusieurs protéines partenaires non-mitochondriales inhibitrices de BAX ont été mises en évidence. Ces interactions pourraient constituer un mécanisme de séquestration de BAX afin d'inhiber son rôle pro-apoptotique en se relocalisant à la membrane mitochondriale.

1) *Interaction avec KU70 dans le cytosol*

La protéine de réparation de l'ADN Ku70, impliquée dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN a également été identifiée comme un partenaire inhibiteur cytosolique de BAX (Cohen et al., 2004). *Amsel et al.* proposent un modèle de régulation de l'apoptose où Ku70 séquestre BAX loin de la mitochondrie. En effet, les protéines BAX nouvellement synthétisées subissent une ubiquitylation qui régule négativement leur fonction pro-apoptotique via leur dégradation par le protéasome. Cependant, après ubiquitylation, BAX s'associe avec Ku70 qui induit la déubiquitylation de BAX, générant une forme potentiellement plus dangereuse de BAX

mais tout en la séquestrant loin de la mitochondrie (**Figure 22**) (Amsel et al., 2008). Dans cette étude, l'inhibition de Ku70 par ARNi entraîne l'accumulation de BAX ubiquitylée dans les lignées cellulaires humaines U2OS. Sous stimulus apoptotique, les cellules *Ku70*^{-/-} montrent une accumulation de BAX ubiquitylée contrairement aux cellules sauvages, et la surexpression de Ku70 dans ces cellules diminue cette accumulation.

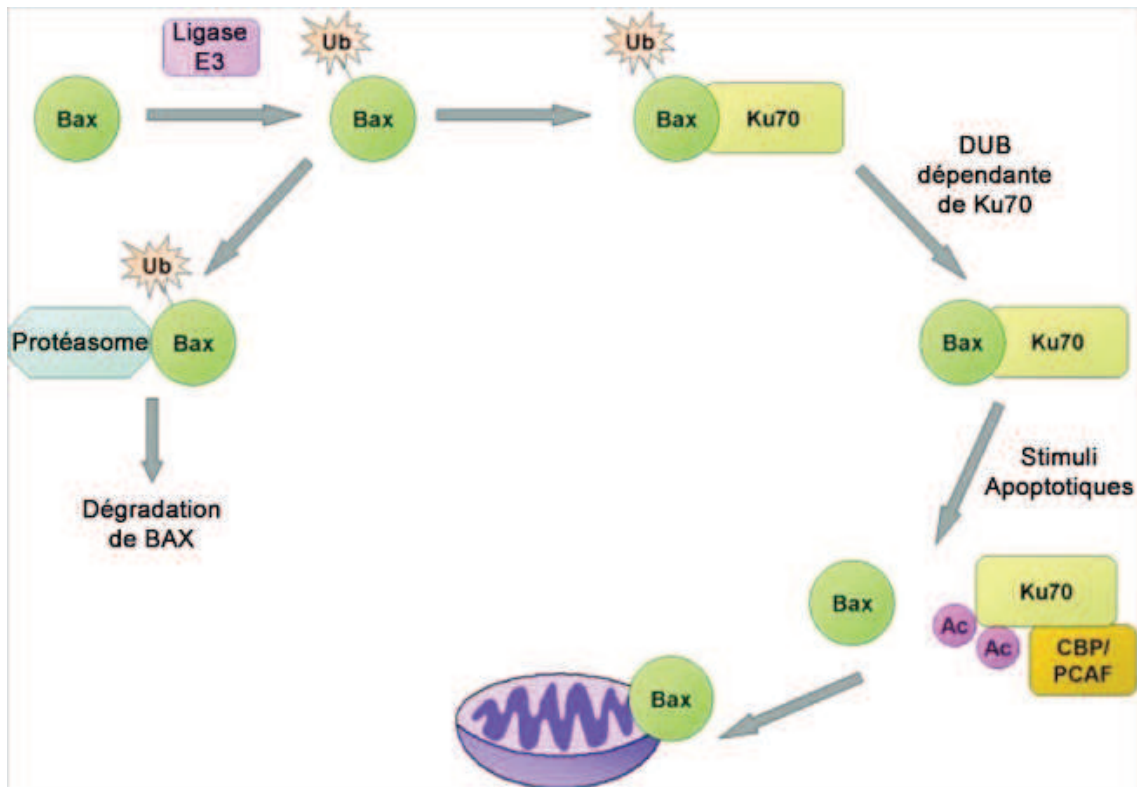


Figure 22 : Modèle de la régulation de l'apoptose induite par BAX par Ku70.

BAX nouvellement synthétisée subit une ubiquitylation qui régule négativement sa fonction pro-apoptotique via sa dégradation par le protéasome. Après son ubiquitylation, BAX s'associe avec Ku70 qui induit la déubiquitylation de BAX, générant et séquestrant simultanément la forme active de BAX loin de la mitochondrie. Sous stimuli apoptotique, Ku70 est acétylée par CBP ou CAF (des acétyltransférases) et relâche BAX. La forme libre BAX non-ubiquitylée peut alors se localiser à la mitochondrie où elle va exécuter le programme de mort cellulaire. *D'après (Amsel et al., 2008).*

De plus, récemment il a été mis en évidence *in vitro* que la Cavéoline-1 pouvait réguler négativement l'apoptose induite par BAX via son interaction avec Ku70 (Zou et al., 2012). En effet, les auteurs observent que l'inhibition de la Cavéoline-1 par ARNi favorise l'apoptose induite par l'étoposide dans les cellules humaines de cancer du colon (HT29 et HCT116). La cavéoline-1 peut se lier à Ku70 par son domaine CBD

(caveolin-binding domain, les acides aminés 82 à 101). La liaison de la cavéoline-1 aux complexes Ku70 / BAX inhiberait ainsi la libération de BAX de ce complexe en cas de stimulus apoptotique. Ces résultats mettent en évidence le rôle inhibiteur de la Cavéoline-1 par interaction avec Ku70 dans la mort cellulaire dépendante de BAX dans ces cellules du cancer du côlon.

2) *Interaction avec la protéine chaperone 14-3-3 θ*

La protéine 14-3-3 θ est une molécule chaperonne qui interagit avec diverses protéines cellulaires (Aitken et al., 2002). Ces protéines semblent être impliquées dans le contrôle de divers processus cellulaires en séquestrant des molécules régulatrices (Dubois et al., 1997). *Nomura et al.* ont mis en évidence l'interaction de la protéine 14-3-3 θ avec la protéine BAX dans le cytosol des cellules Hela et NITH3T3 non-apoptotique (Nomura et al., 2003). L'interaction implique l'extrémité C terminale de BAX et n'est pas dépendante de sa phosphorylation. La protéine 14-3-3 θ est ainsi capable d'empêcher la relocalisation de BAX vers la mitochondrie et d'inhiber l'apoptose induite via le récepteur Fas dans ces cellules. Cette inhibition peut être levée lors du clivage de 14-3-3 θ par les caspases entre autres.

3) *Interaction avec la protéine co-chaperone p23HSP90*

La protéine BAX est maintenue inactive dans le cytosol par le repliement de son domaine transmembranaire C terminal dans une poche hydrophobique. De nombreuses études, comme celles qui sont citées dans le paragraphe précédent suggèrent que la forme inactive de BAX est stabilisée par son interaction avec des protéines régulatrices. Une étude récente de l'équipe de *Czabotar* par protéomique remet en question cette régulation de BAX par son interaction avec des protéines régulatrices (Vogel et al., 2012). En effet, l'analyse par spectrométrie de masse des complexes cytosoliques BAX après immunoprécipitation ou purification consécutive par filtration de gel et électrophorèse sur gel natif n'a permis d'identifier qu'une seule protéine : une co-chaperonne nommée p23hsp90. L'inhibition ou la surexpression de p23hsp90 n'a montré aucun effet sur l'apoptose. Ces différences peuvent être dues à des problèmes de sensibilité des techniques utilisées (spectroscopie de masse), du type et du contexte

cellulaire. En ce qui concerne l'approche par immunoprécipitation, il est aussi possible que l'accessibilité de BAX au sein de multiples complexes protéiques était limitée en condition native après filtration sur gel. Cette étude met aussi en évidence que la forme cytosolique de BAX avait une masse moléculaire apparente différente de la protéine BAX recombinante sur gel d'électrophorèse, suggérant des modifications post-traductionnelles de BAX dans un contexte cellulaire.

V. FONCTIONS NON-APOPTOTIQUES DE BAX ET DES AUTRES MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2

Au-delà de leur rôle dans le programme apoptotique, les protéines de la famille Bcl-2 ont été impliquées dans divers processus physiologiques : la progression du cycle cellulaire, métabolisme mitochondrial, l'autophagie, les réponses de dommages à l'ADN et la migration.

1) Régulation du cycle cellulaire par les protéines de la famille BCL-2

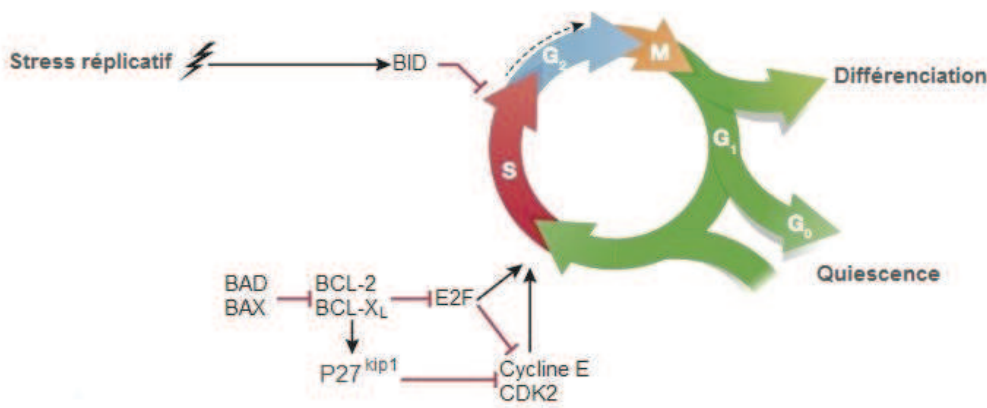


Figure 23 : Régulation du cycle cellulaire par les protéines de la famille BCL-2.
D'après (Galluzzi et al.).

Plusieurs études avaient mises en évidence un rôle de BCL-2 et BCL-xL dans l'entrée en phase S du cycle cellulaire dans des thymocytes provenant de tissus de souris (O'Reilly et al., 1996), des lignées cellulaires NIH 3T3 (O'Reilly et al., 1996), (Janumyan et al., 2003). D'autres études ont étudié les mécanismes moléculaires de cette régulation du cycle cellulaire par les protéines de la famille BCL-2. Il a été mis en évidence que BCL-2 pouvait retarder la progression du cycle cellulaire entre les phases G1/S en inhibant CDK2 (Gil-Gomez et al., 1998), en activant l'expression de P27^{Kip1} (CDKN1B) (Vairo et al., 2000) et/ ou en interférant avec l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription E2F (Vairo et al., 2000), (Lind et al., 1999). En effet, *Gil-Gomez et al.* observent que la surexpression de Bcl-2 dans les thymocytes de souris mène à la résistance de l'apoptose induite par Fas et à une inhibition de l'activité de CDK2 (Gil-Gomez et al., 1998). *Lind et al.* observent que la surexpression de Bcl-2 induit des changements de formation du complexe d'E2F avec P130 (RBL2 ou retinoblastoma-like 2) menant à une diminution de l'activité transcriptionnelle de *E2F* dans les cellules murines FDC-P1 (Lind et al., 1999). De la même manière, *Vairo et al.* montrent que BCL-2 retarde la progression du cycle cellulaire en augmentant le niveau d'expression de P27^{Kip1} et P130 et en altérant négativement la régulation du gène *E2F* dans les lignées de fibroblastes embryonnaires de souris immortalisées NIH 3T3 (Vairo et al., 2000).

Parallèlement, il a été mis en évidence qu'au contraire, les protéines pro-apoptotiques BAX et BAD stimulaient la progression du cycle cellulaire. En effet, *Gil-Gómez et al.* observent que BAX peut augmenter l'activation de CDK2 dans les thymocytes (Gil-Gomez et al., 1998) et *Janumyan et al.* montrent que BAD est capable de renverser l'effet de BCL-2 et de BCL-xL sur la progression du cycle cellulaire (Janumyan et al., 2003).

De plus, l'étude de *Kramer et al.* met en évidence le rôle du pro-apoptotique BH3-only BID dans la régulation du cycle cellulaire suite à un stress réplicatif (Kamer et al., 2005). Contrairement aux cellules sauvages, les cellules MEF *Bid*^{-/-} ne s'accumulent pas en phase S en réponse à l'étoposide (poison de la topoisomérase II). Seule la surexpression d'un mutant BID phosphorylable dans les cellules *Bid*^{-/-} permet de restaurer cette accumulation en phase S des cellules. Les auteurs mettent ainsi en évidence l'importance de la localisation partielle de BID dans le noyau des cellules

saines dans l'apoptose induite par les dommages à l'ADN. De plus, les auteurs montrent que BID est phosphorylé par la kinase ATM après l'induction des cassures doubles brins de l'ADN.

Un peu plus récemment, il a été mis en évidence que BAX et BAK, ainsi que BCL-xL et BCL-2 jouaient un rôle essentiel dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase de quiescence cellulaire G0 via la régulation de l'expression de P27^{kip1} (Janumyan et al., 2008). Les auteurs observent que l'expression de BCL-2 et BCL-xL dans les MEF *Bax*^{-/-} *Bak*^{-/-} n'ont pas d'effet sur la progression du cycle cellulaire. De plus, dans les MEF *Bax*^{-/-} *Bak*^{-/-} l'expression de P27^{kip1} et de P27^{kip1} phosphorylée (sérine 10) est augmentée par rapport aux MEF *wt*. Dans ce modèle, BAX et BAK exercent un effet négatif sur la phosphorylation de P27^{kip1} maintenant un niveau faible de l'expression de P27^{kip1}, tandis que BCL-2 et BCL-xL opposent des effets négatifs à BAX et BAK pour entraîner l'accumulation de P27^{kip1} phosphorylé par la protéine kinase Mirk.

En résumé, ces travaux suggèrent un rôle inhibiteur des protéines anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-xL dans la progression du cycle cellulaire entre les phases G1/S via le contrôle de l'expression du gène *E2F* ou via l'expression et/ou la phosphorylation de la protéine P27^{kip1} (**Figure 23**). Alors, que les pro-apoptotiques BAX et BAK ainsi que le pro-apoptotique BH3-only BAD semble exercer un rôle activateur de la progression du cycle cellulaire en renversant les effets inhibiteurs des anti-apoptotiques sur celui-ci. Et enfin, le pro-apoptotique BH3-only BID est capable de se relocaliser dans le noyau des cellules où il va être phosphorylé suite à un stress réplcatif et entraîner l'arrêt du cycle cellulaire en phase S.

2) Implications des protéines de la famille BCL-2 dans la bioenergetique mitochondriale

a) Métabolisme de le chaîne respiratoire

Alavian et al. ont mis en évidence le rôle de l'anti-apoptotique Bcl-xL dans le métabolisme mitochondriale dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe de rat (Alavian et al., 2011). Au niveau de la membrane interne mitochondriale des neurones, BCL-xL interagit directement avec la sous-unité-β de l'ATPase F₁F₀. Ce complexe enzymatique permet la régulation du gradient électrochimique généré par les

complexes I et IV respiratoires pour synthétiser l'ATP (**Figure 24**). En effet, la surexpression de BCL-xL augmente le niveau de l'activité ATPase du complexe F_1F_0 purifiés in vitro et l'inhibition de BCL-xL endogène diminue le niveau de l'activité enzymatique de ce même complexe F_1F_0 . Cette étude met en évidence, un nouveau rôle non-apoptotique de BCL-xL dans le maintien de l'efficacité du métabolisme synaptique des neurones via l'augmentation de l'efficacité de la chaîne respiratoire mitochondriale.

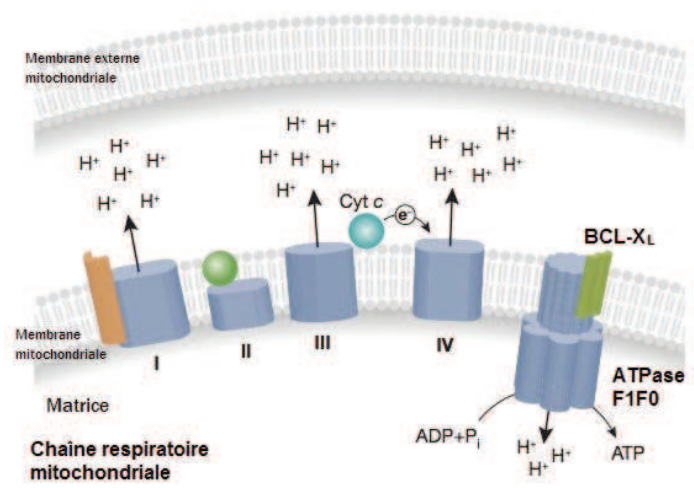


Figure 24 : Rôle métabolique de BCL-xL dans la chaîne respiratoire mitochondriale.
BCL-xL interagit avec l'ATPase F_1F_0 et stimule son activité enzymatique. D'après (Galluzzi et al.).

De plus, tout récemment il a été mis en évidence l'implication de la protéine BAX dans la dynamique mitochondriale. Cette étude montre pour la première fois une implication de BAX dans des fonctions cellulaires autres qu'apoptotiques sans implication des autres membres de la famille Bcl-2 (Boohaker et al., 2011). Boohaker et al. ont mis en évidence que BAX était nécessaire pour maintenir la production d'énergie mitochondrial dans les cellules non-apoptotiques de cancer du colon (HCT116) invalidées ou non pour le gène *BAX*. Le niveau d'ATP cellulaire et la consommation d'oxygène sont réduits dans les cellules *BAX*^{-/-}. De plus une surexpression de *BCL-2* dans les cellules contenant BAX entraîne une perte d'ATP dans des conditions non-apoptotiques. Ces données suggèrent qu'une quantité minimale protéine de BAX à la mitochondrie est nécessaire pour maintenir la production d'énergie via la respiration aérobie. Les auteurs proposent un modèle où sous des conditions non-apoptotiques, une petite quantité de BAX « actif » peut être associé avec le bon fonctionnement architectural et la bioénergétique de la mitochondrie (à des concentrations bien

inférieures à celle pouvant induire l'apoptose). En condition normale, quelques monomères et dimères de BAX peuvent s'insérer dans la membrane mitochondriale pour former des petits pores, mais ce procédé a besoin d'être finement régulé. Il est aussi possible que BAX interagisse avec d'autres protéines mitochondriales impliquées dans la production énergétique.

b) Métabolisme du Calcium

Plusieurs études ont mis en évidence que les protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques pouvaient réguler l'homéostasie du Ca^{2+} au niveau de la mitochondrie.

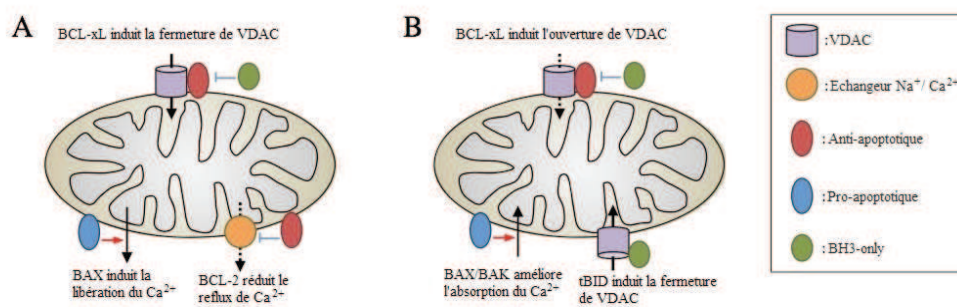


Figure 25: Régulation du calcium par les protéines de la famille BCL-2.

D'après (Bonneau et al., 2013).

Il a été mis en évidence pour la première fois que l'anti-apoptotique BCL-2 pouvait réguler l'homéostasie du Ca^{2+} mitochondriale dans les cellules neurales murines immortalisées (GT1-7). Dans cette étude, la surexpression de Bcl-2 permet à la mitochondrie de stocker plus de Ca^{2+} sans provoquer de défauts respiratoires mitochondriaux (Murphy et al., 1996). Une autre étude montre en fait que Bcl-2 peut induire la diminution l'activité de l'échangeur $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$, ce qui entraîne la diminution du flux calcique à partir de la mitochondrie (**Figure 25A**) (Zhu et al., 2001).

En ce qui concerne les protéines pro-apoptotiques, il a été montré que BAX pouvait favoriser la libération du cytochrome C induite par la Ca^{2+} dans des mitochondries isolées de cellules de foie de rat suggérant que BAX pourrait contribuer à l'entrée du Ca^{2+} dans la mitochondrie (Gogvadze et al., 2001). Une autre étude met en évidence le rôle de la suexpression de BAX et BAK (adénovirus) dans l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} et la libération du cytochrome C dans la mitochondrie des cellules humaines PC-3 (Nutt et al., 2002) (**Figure 25B**). A l'inverse, une étude propose que

BAX peut induire la libération du Ca^{2+} à partir de la mitochondrie dans les cellules du SNC de rats (astrocytes) (**Figure 25A**). En effet, la surexpression du recombinant BAX induit une perte du potentiel mitochondrial entraînant la perméabilisation de la membrane mitochondriale contribuant à la libération du Ca^{2+} à partir de la mitochondrie (Carvalho et al., 2004). Ces résultats suggèrent que BAX altère l'homéostasie du Ca^{2+} à la mitochondrie, fonction qui pourrait être corrélée avec l'activité pro-apoptotique de BAX.

c) Métabolisme du glucose

Le membre pro-apoptotique de la famille BCL-2, BAD a été identifié comme un régulateur du métabolisme du glucose dans les hépatocytes primaires provenant de souris (Danial et al., 2003). En effet, BAD phosphorylé régule le métabolisme du glucose et la bioénergétique de la mitochondrie dans les hépatocytes de souris. En effet, les auteurs observent que BAD réside dans la mitochondrie des hépatocytes dans un complexe holoenzyme fonctionnel avec la protéine kinase A et la protéine phosphatase 1 (PP1), l'héxokinase IV (GK), et la protéine d'ancrage kinase A WAVE-1 (Wiskott-Aldrich family member). Les souris *Bad*^{-/-} et l'expression d'une forme non phosphorylé de BAD mettent en évidence le rôle de BAD phosphorylé dans la formation de ce complexe qui permet l'activité glucokinase (GK) à la mitochondrie.

En plus, du rôle de la forme phosphorylée de BAD dans la régulation de la respiration mitochondriale, la même équipe a mis en évidence un nouveau rôle de BAD dans la sécrétion d'insuline et l'homéostasie du glucose dans la survie des cellules β du pancréas (Danial et al., 2008). Dans les souris *Bad*^{-/-} la fonction des cellules β et l'activité GK sont altérées. La première phase de sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose est inhibée dans les souris *Bad*^{-/-}. Cette étude a montré que la phosphorylation du domaine BH3 de BAD sur le résidu sérine en position 155 jouait un rôle central dans l'activation de la glukokinase et la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas. Ces études de *Danial et al.* mettent en évidence le rôle de la phosphorylation de BAD dans la régulation du métabolisme des hépatocytes et des cellules β du pancréas.

3) Implications de la protéine BAX dans l'homéostasie du réticulum endoplasmique

a) La réponse UPR

L'accumulation de protéines mal pliées dans le réticulum endoplasmique (RE) déclenche la réponse adaptative du stress nommée l'UPR (Unfolded Protein Response). L'UPR est induite par la protéine kinase transmembranaire ER et l'endoribonucléase IRE1 α (inositol-requiring enzyme-1 α). L'étude des souris double KO *Bax*^{-/-} *Bak*^{-/-} a mis en évidence l'implication de BAX et BAK dans la régulation de l'UPR. En effet, les souris doubles KO montrent dans le foie des dommages tissulaires importants et une diminution de l'expression du substrat et des gènes cibles d'IRE1 α par le stress du RE induit par la tunicamycine (drogue du RE). L'étude dans les MEFs double KO *Bax*^{-/-} *Bak*^{-/-} a permis de mettre en évidence la formation du complexe BAX-BAK- IRE1 α qui active la signalisation de l'IRE1 α (Hetz et al., 2006).

4) Implications des protéines de la famille BCL-2 dans l'homéostasie tissulaire et cellulaire

a) L'inflammation

Bruey et al. ont mis en évidence le rôle de Bcl-2 et Bcl-XL dans l'activation de la caspase-1 pro-inflammatoire. L'activation de la pro-caspase-1 par l'inflammasome permet la maturation et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires interleukine 1 β (IL-1 β) et IL-18 (Lamkanfi and Dixit, 2009). *Bruey et al.* ont identifié un analogue murin de la famille des récepteurs NLR, NALP1 qui détecte les composés microbiens et entraîne l'assemblage du complexe nommé inflammasome activant la caspase-1 dans les cellules humaines de rein embryonnaires (HEK293T). Les auteurs observent que Bcl-2 et Bcl-XL peuvent interagir et inhiber NALP1, entraînant la diminution de l'activation de la caspase-1 et la production d'IL-1 β dans les cellules HEK293T et les macrophages. Les macrophages déficients en BCL-2 exposés au dipeptide-muramyl ligand (MDP) murin montrent une augmentation d'activation de la caspase-1 et de la production d'IL-1 β , tandis que les macrophages surexprimant BCL-2 montrent une diminution de

l'activation de la caspase-1 et de la production d'IL-1 β . Ces résultats identifient un nouveau rôle de BCL-2 et BCL-xL dans la régulation de l'inflammation par l'inhibition de l'inflammasome via l'interaction avec NALP1 (Bruey et al., 2007).

Yeretssian et al. ont observé une implication de la protéine pro-apoptotique BH3-only BID dans l'inflammation et l'immunité innée (Yeretssian et al., 2011). Les NOD (nucleotide-binding oligomerization domain containig) sont des protéines cytosoliques importantes dans l'intestin et dont la dérégulation est associée à des maladies inflammatoires de l'intestin (Cho, 2008). Dans cette étude publiée dans Nature, les auteurs observent un défaut de production de cytokine dans les cellules épithéliales du colôn (colonocytes) et les macrophages de souris *Bid*^{-/-} en réponse à l'activation des NOD. Les auteurs montrent que BID peut interagir avec les PRRs (pattern recognition receptor) cytosoliques de la famille NOD pour faciliter la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à des agonistes NOD. Cependant, cette fonction de la protéine BID entière comme un médiateur de l'inflammation et de l'immunité innée a été remise en cause par l'étude de *Nachbur et al.* qui n'a pas réussi à reproduire les expériences de *Yeretssian et al.* en utilisant les mêmes souris *Bid*^{-/-} (Nachbur et al., 2012). Dans cette lettre aussi publiée dans Nature, les auteurs n'observent pas de différence de réponse entre les souris *Bid*^{-/-} et les souris sauvages en réponse aux ligands NOD et le niveau d'activation et de cytokines de sécrétions des macrophages provenant des souris *Bid*^{-/-} ne diffère pas de celles des souris sauvages. En conclusion, le rôle de BID dans l'inflammation reste un sujet à polémique car le papier initial de Yeretssian et collaborateur n'a pas été rétracté ou corrigé à l'heure actuelle.

b) Autophagie

La macroautophagie, appelée couramment autophagie, est un mécanisme permettant à la cellule de digérer une partie de son contenu, que ce soit du cytoplasme, des protéines ou des organites cellulaires. C'est la seule voie qui puisse dégrader massivement des macromolécules et des organites, c'est une voie de dégradation alternative à celle du protéasome. L'autophagie permet ainsi le maintien de l'homéostasie cellulaire car elle permet l'élimination et le remplacement continu des protéines et des organites non fonctionnels. Elle permet aussi l'adaptation et la survie des cellules soumises à des conditions de stress. En ce qui concerne cette fonction de

survie, plusieurs protéines anti- et pro-apoptotiques ont été impliquées dans la régulation de l'autophagie. La protéine Beclin 1 (BECN1) est le régulateur principal de l'autophagie et a été identifiée comme une protéine BH3. En effet, elle possède un domaine BH3 d'homologie à BCL-2 et ce domaine peut interagir avec certains anti-apoptotiques BCL-2 (Maiuri et al., 2007a), (Oberstein et al., 2007) (**Figure 26**).

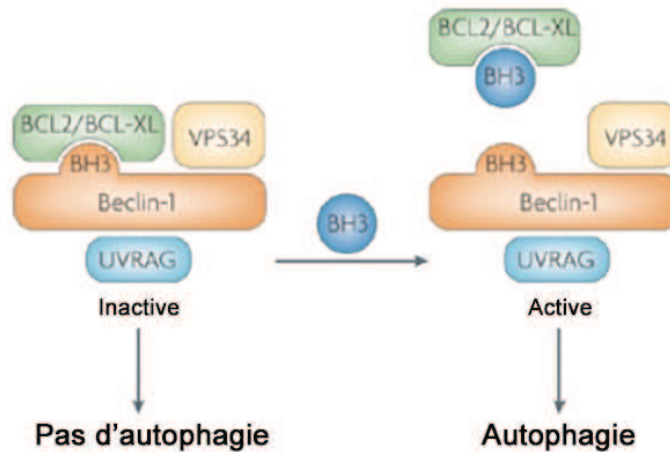


Figure 26 : Les protéines BH3 et les mimétiques agissent sur les interactions Beclin-1-BCL-2.
D'après (Maiuri et al., 2007c).

L'association de Beclin 1 avec les protéines VPS34 (Phosphatidylinositol 3-kinase) et UVRAG (UV irradiation resistance-associated tumour suppressor gene) est essentielle pour induire l'autophagie. UVRAG stimule l'interaction entre VPS34 et Beclin1, ainsi que l'activité de VPS34 (Liang et al., 2006).

Il a été mis en évidence que les protéines anti-apoptotiques BCL-2 (Pattingre et al., 2005), BCL-xL (Oberstein et al., 2007), (Maiuri et al., 2007b) MCL-1 (Maiuri, 2007 #481} et BCL-B (Robert et al., 2012) pouvaient interagir et inhiber le régulateur principal de l'autophagie Beclin 1 (BECN1). Et à l'inverse, il a été mis en évidence que les pro-apoptotiques BH3-only BAD (Maiuri et al., 2007b), BIM, BID, PUMA stimulaient l'autophagie, grâce à leur capacité à rentrer en compétition avec Beclin 1 pour interagir avec les anti-apoptotiques, libérant ainsi BECN1 de la régulation négative exercée par les anti-apoptotiques dans des conditions physiologiques (Maiuri et al., 2007a) (**Figure 27**).

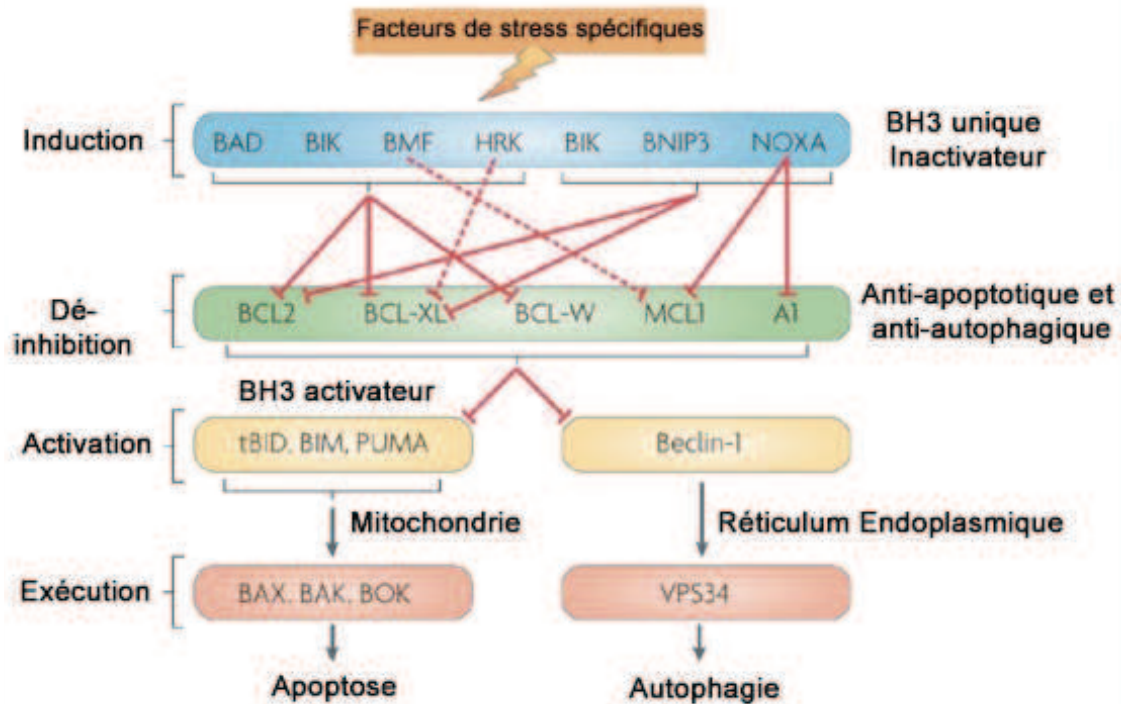


Figure 27: Régulation de l'apoptose et de l'autophagie par les protéines de la famille BCL-2.
D'après (Maiuri et al., 2007c).

Il a été mis en évidence que les effets inhibiteurs de BCL-2 et BCL-xL sur l'autophagie dépendaient de leur localisation cellulaire. En effet, seules les protéines BCL-2, BCL-xL localisée au niveau du RE et non à la mitochondrie inhibent l'autophagie induite par la déprivation en nutriment et la surexpression de Beclin 1 (Patingre et al., 2005). Récemment, il a aussi été mis en évidence que Bcl-B interagissait avec Beclin 1 principalement dans le RE et induisait l'autophagie dans des lignées cellulaires humaines cancéreuses (Robert et al., 2012).

Dans le paragraphe précédent sur la régulation des protéines de la famille BCL-2 dans la progression cellulaire, l'implication de BCL-2 et BCL-xL dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase quiescente par la sur-régulation de P27^{Kip1} a été citée. De manière intéressante, Cui et al. ont mis en évidence l'activation de l'autophagie en plus de l'arrêt du cycle cellulaire induite par BCL-2 et BCL-xL (Cui et al., 2009) (**figure 28**).

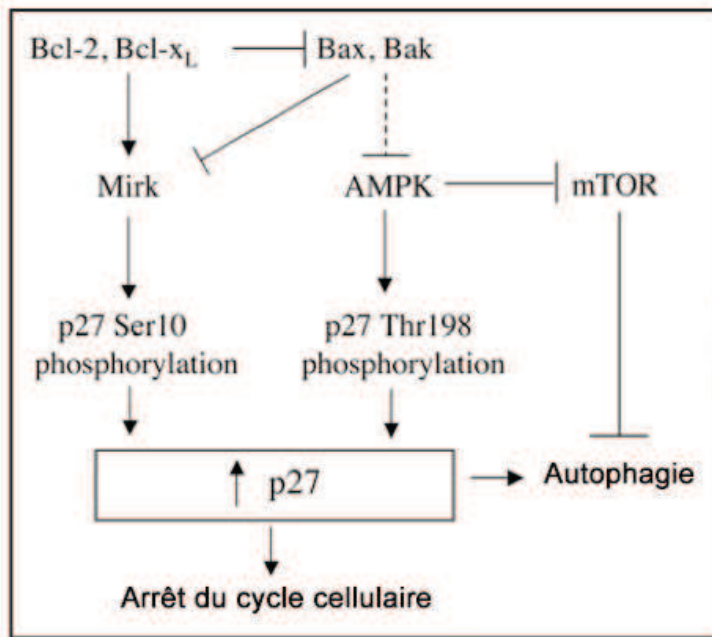


Figure 28: Modèle du rôle de BAX et BAK dans la régulation de P27.

En accord avec ce modèle, les doubles KO *Bax*^{-/-} *Bak*^{-/-} entraîne l'augmentation de P27 phosphorylé en sérine 10 et thréonine 198, et l'activation de l'autophagie. D'après (Cui et al., 2009).

Cependant, l'activation de l'autophagie n'est pas requise pour l'arrêt en phase G0 dans cette étude. Les auteurs observent dans les souris *Bax*^{-/-} *Bak*^{-/-} l'augmentation de P27 phosphorylé en thréonine 198, de Atg5 et la conversion de LC3-I en LC3-II qui se produisent au cours de l'autophagie. Ces résultats suggèrent un rôle de Bax et Bak suppresseur de l'autophagie.

c) La migration

Cette année, Koehler et al. ont mis en évidence l'implication des anti-apoptotiques MCL-1, BCL-2 et BCL-xL dans la migration et l'invasion des cellules de cancer colorectal. En effet, l'inhibition de MCL-1, BCL-2 et BCL-xL diminue la migration des lignées cellulaires HT29 et SW480 dans un modèle de plaie et dans un modèle de cultures 3D. L'inhibition de Bcl-2 cause l'inhibition de la migration la plus importante dans ces deux modèles. A l'inverse, la sur-expression de ces anti-apoptotiques renverse complètement ce phénotype dans le modèle de plaie. De plus, les auteurs observent que l'inhibition de ces anti-apoptotiques diminue l'invasion des cellules de cancer colorectal dans un test d'invasion (chambre d'invasion matrigel) (Koehler et al., 2013).

d) La survie neuronale

Il a été mis en évidence récemment que les pro-apoptotiques BAX et BAD favorisaient in vitro la survie des neurones en réponse au processus de plasticité neuronal appelé « dépression synaptique à long terme » (DLT) (Jiao and Li, 2011). La dépression à long terme se caractérise par une diminution de l'efficacité de la transmission synaptique sur une longue période de temps. Les auteurs ont montré que les neurones de l'hippocampe activent de manière sub-létale la caspase-3 en cas de DLT (Lu et al., 2006), (Li et al., 2010). Dans ce modèle, contrairement à l'apoptose, BAD est activée dans une moindre mesure et la translocation de la protéine BAX à la mitochondrie n'est pas induite. De plus, l'activation faible et transitoire de la caspase-3 par BAX et BAD est nécessaire à l'établissement de la DLT (Jiao and Li, 2011). Il faut noter qu'une activation faible et non létale de la caspase 3 a été aussi impliquée dans la différenciation des cellules de la cornée et des fibres musculaires (Galluzzi et al.).

En conclusion, il est maintenant évident que les protéines de la famille BCL-2 initialement découvertes pour leur rôle essentiel dans l'apoptose sont aussi impliquées dans une grande variété d'activités cellulaires non-apoptotiques. En particulier, l'ensemble de ces travaux confirme bien que la protéine BAX est impliquée dans d'autres fonctions que le contrôle de l'apoptose mitochondriale.

CHAPITRE II- LA FIBROSE PULMONAIRE IDIOPATHIQUE

La fibrose pulmonaire est caractérisée par l'accumulation de composants de la matrice extracellulaire (MEC) et de fibroblastes dans les espaces aériens distaux. La désorganisation et la destruction alvéolaires qui résultent de la fibrose aboutissent à une altération des propriétés mécaniques du poumon et à une incapacité à réaliser les échanges gazeux responsables d'une insuffisance respiratoire parfois mortelle (Raghu et al., 2011). L'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires jouerait aussi un rôle central dans le développement de la fibrose pulmonaire.

I. INCIDENCE

Chez l'homme, la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est la pneumopathie interstitielle chronique avec le pire pronostic de mortalité de 50%, 3 à 5 ans après le diagnostique (Raghu et al., 2011). C'est une maladie progressive et irréversible qui entraîne une insuffisance respiratoire sévère puis mortelle. La FPI se développe à l'âge adulte entre 55 et 75 ans. L'incidence annuelle de la FPI est actuellement estimée entre 4,6 et 16,3 pour 100 000 personnes et la prévalence est de 13 à 20 cas pour 100 000 personnes. Cette pathologie est plus fréquente chez les hommes que chez les femmes (1,5 contre 1,7 :1) et la fréquence augmente avec l'âge. Actuellement, il n'existe pas de traitement pharmacologique efficace contre la FPI.

II. FACTEURS DE RISQUES

Même si la cause de la FPI reste inconnue par définition, certains facteurs de risques ont été identifiés, notamment le tabagisme, les expositions environnementales répétées aux poussières de métaux ou de bois (Baumgartner et al., 1997), (Hubbard et al., 1996). En dehors de ces facteurs de risques environnementaux, des déterminants génétiques chez des patients avec une FPI ont été identifiés, notamment, quatre gènes

qui codent pour les deux protéines du surfactant A2 (codé par le gène *SFTPA*) et C (codé par *SFTPC*), et deux composants du complexe télomérase : la télomérase transcriptase inverse (*TERT*) et l'ARN de la télomérase (*TERC*). Ces approches génétiques ont permis la découverte de processus important dans la pathogenèse de la FPI, dont le stress du réticulum endoplasmique, les voies de dommage et de réparation à l'ADN, ainsi que la sénescence cellulaire (Kropski et al., 2013).

III. CARACTERISTIQUES HISTOLOGIQUES

La FPI est une maladie qui se limite aux poumons et qui est associée à un aspect histologique de pneumopathie interstitielle commune (UIP). L'UIP est associée à des zones de fibrose, c'est-à-dire avec une accumulation excessive de fibroblastes et de myofibroblastes, de matrice extracellulaire dans les zones sous-pleurales et parasetpales, d'un épithélium hyperplasique correspondant aux lésions rayon de miel, ainsi que des foyers fibroblastiques (**voir figure 29**). Les foyers fibroblastiques correspondent à des zones où l'on retrouve une accumulation exagérée de myofibroblastes. Un des aspects majeur histopathologique de l'UIP est une hétérogénéité spatiale et temporelle des lésions pulmonaires, avec une alternance de zones de fibrose, des zones moins affectées voir de parenchyme normale (Visscher and Myers, 2006), (King et al., 2011). L'inflammation chronique est présente, mais n'est pas une caractéristique proéminente de l'UIP (Raghu et al., 2011).

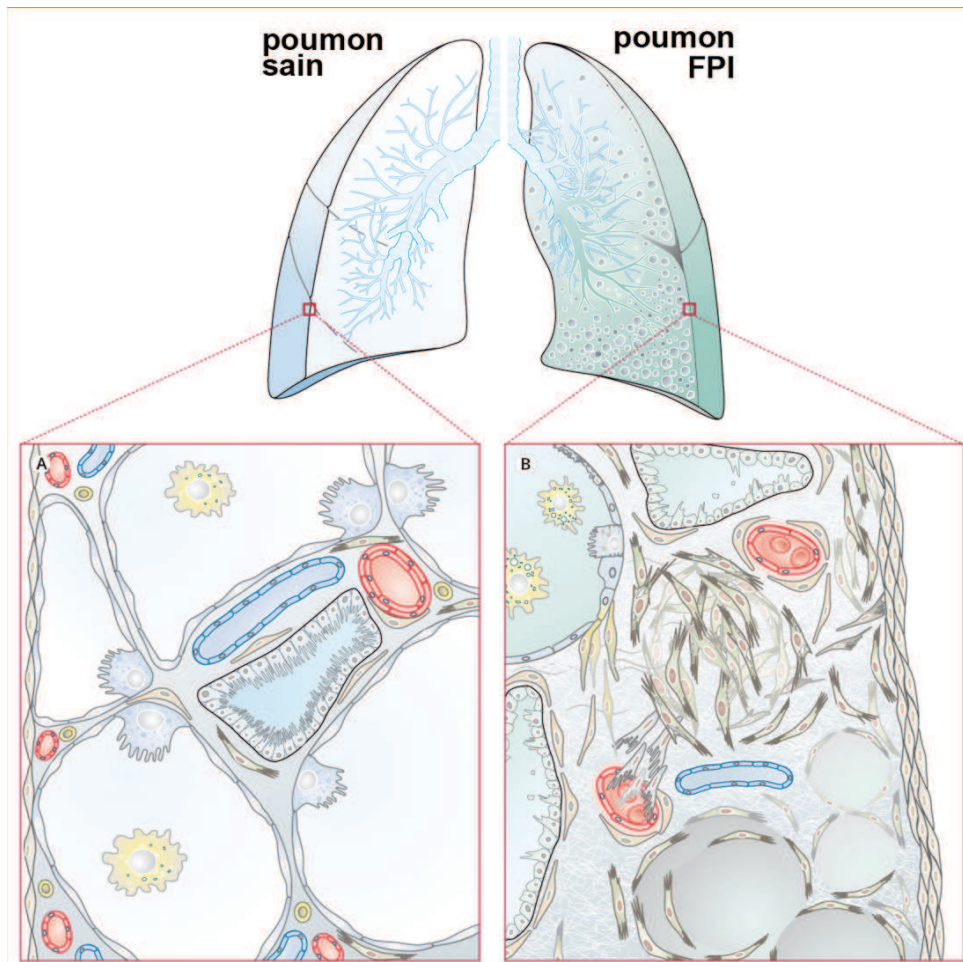


Figure 29: Schémas d'un poumon sain (A) ou atteint de fibrose pulmonaire idiopathique (B).
D'après (Fernandez and Eickelberg, 2012).

IV. PHYSIOPATHOLOGIE

Le développement de la fibrose pulmonaire résulterait d'une réparation excessive suite à une agression épithéliale pulmonaire chronique. Suite à une agression, les cellules épithéliales et endothéliales lésées vont relâcher des médiateurs solubles qui vont entraîner le remodelage de la MEC et permettre le recrutement de cellules inflammatoires sur le site de l'agression. Ces cellules vont à leur tour sécréter diverses cytokines pro-fibrotiques qui vont transformer l'ensemble des fibroblastes locaux ou dérivés de précurseurs circulants en myofibroblastes exprimant l' α -SMA (alpha-smooth muscle actin) et produisant des composants de la MEC en plus grande quantité.

1) Les myofibroblastes dans les foyers fibroblastiques

Les fibroblastes ne possèdent pas de biomarqueurs spécifiques permettant de les identifier. Ils sont caractérisés par leur forme allongée, leur localisation dans l'interstitium et l'expression de marqueurs mésenchymateux généraux. Lors de la réparation tissulaire, les fibroblastes vont acquérir un phénotype de type myofibroblastique. En effet, les cellules épithéliales endommagées et les cellules inflammatoires recrutées sur le site de la lésion vont sécréter diverses cytokines pro-fibrotiques comme le TGF- β 1 (transforming growth factor- beta 1), le PDGF (platelet derived growth factor), l'endothéline 1 (ET-1), le FGF (fibroblast growth factor), le CTGF (connective tissue growth factor) et l'IL-13 qui vont différencier le pool de fibroblastes local et les fibroblastes recrutés en myofibroblastes. Les myofibroblastes ont été décrits pour la première fois en 1972 dans les plaies de la peau. Comme les fibroblastes dont ils sont dérivés, ils ne possèdent pas de biomarqueurs spécifiques. Cependant, ils sont essentiellement caractérisés, morphologiquement par la formation de fibres de stress, biochimiquement par leur expression de protéines actine-myosine et physiologiquement par leur capacité fonctionnelle à contracter les tissus (Gabbiani and Majno, 1972), (Hinz et al., 2012). Un des marqueurs principalement utilisé est l' α -SMA, même si il n'est pas spécifique car partagé avec les cellules du muscle lisse, il est essentiel pour générer l'activité contractile maximale des myofibroblastes (Hinz et al., 2002). Les myofibroblastes avec cette fonction contractile facilitent la fermeture de la plaie et sont ensuite éliminés par apoptose pour permettre une restauration complète des tissus (Desmouliere et al., 1995). La persistance des myofibroblastes dans les foyers fibroblastiques est une caractéristique de la fibrose pulmonaire. Ces myofibroblastes vont sécréter localement des protéines de la MEC tel que le collagène I et la fibronectine, ainsi que des médiateurs pro-fibrosants tel que l'angiotensine, des espèces réactives d'oxygène (ROS) tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Psathakis et al., 2006). L'origine des ces myofibroblastes qui s'accumulent dans les foyers de fibrose actifs se pose encore. Parmi les hypothèses actuelles, on retrouve 1) l'activation des cellules mésenchymateuses résidentes (fibroblastes et péricytes) (Zhang et al., 1994) 2) l'activation de l'épithélium alvéolaire par transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Markwald et al., 1996), de l'endothélium par transition endothélio- mésenchymateuse

(EndoMT) (Zeisberg et al., 2007) et de la plèvre par transition mésothélio-mésenchymateuse (Patel et al., 2010), 3) le recrutement des précurseurs mésenchymateux circulants (Greenhalgh et al., 2013).

2) Atteinte de l'intégrité des cellules épithéliales alvéolaires

L'épithélium alvéolaire est composé de deux types de cellules épithéliales alvéolaires: les pneumocytes de type I qui recouvrent environ 85% de la surface alvéolaire et les pneumocytes de types II. Les cellules de type I avec l'endothélium des capillaires forment ainsi l'interface air-sang, essentielle pour les échanges gazeux. Les pneumocytes de type II sont caractérisés par des organites spécifiques, les corps lamellaires, granules sécrétant le surfactant pulmonaire. Ce surfactant joue un rôle de tensioactif à la surface des alvéoles et facilite les échanges gazeux. Les cellules de type II assurent aussi le renouvellement de l'épithélium alvéolaire dans des conditions aussi bien physiologiques que pathologiques. Les cellules de type II vont ainsi assurer leur propre renouvellement ainsi que celui des cellules de type I qui sont elles incapables de se diviser. De plus, les cellules de type II peuvent sécréter des facteurs de croissance, des cytokines et des chimiokines qui vont favoriser le recrutement et l'activation des leucocytes qui vont participer à la réparation des tissus. Elles peuvent aussi produire des enzymes et des protéines de la MEC permettant le développement d'une MEC provisoire en cas d'agression.

V. LES MODELES ANIMAUX DE FIBROSE

L'utilisation des modèles animaux de fibrose en recherche scientifique a permis de mieux comprendre la physiopathologie de la fibrose pulmonaire. Ces modèles d'étude in vivo, substitution pour les patients atteints de fibrose pulmonaire sont utilisés pour identifier les interactions cellulaires et les voies moléculaires impliquées dans la réparation du tissu pulmonaire et la fibrose. Cependant, ces modèles animaux ne reproduisent pas toutes les caractéristiques histologiques de la fibrose pulmonaire.

Chez l'homme, la fibrose pulmonaire humaine est caractérisée par une agression des cellules épithéliales alvéolaires avec des zones de cellules épithéliales hyperplasiques,

une accumulation de fibroblastes et de myofibroblastes en foyer et des dépôts de protéines de la matrice extracellulaire. Ce qui amène à une perte progressive de l'architecture pulmonaire et à une insuffisance respiratoire. De plus, on observe une hétérogénéité spatiale et temporelle des lésions pulmonaires, avec une alternance des zones de fibrose et des zones moins affectées. La fibrose pulmonaire est généralement une maladie à progression lente, mais parfois on observe une accélération de la maladie connue sous le nom d'exacerbation aigüe. Chez l'animal, il est difficile de reproduire cette nature progressive de la maladie, ainsi que le caractère perpétuel de la maladie. Dans les modèles animaux, la maladie est souvent d'une durée courte en comparaison avec la maladie humaine qui se développe sur plusieurs années (Chua et al., 2005).

La stratégie la plus fréquente pour induire la fibrose est une agression alvéolaire par administration directe d'agent profibrotique comme la bléomycine, la silice, la Fluorescéine Isothiocyanate (FITC), soit à des animaux de type sauvage ou soit à des animaux portant une modification génétique spécifique. Mais il existe aussi des modèles murins de fibrose induits par irradiation pulmonaire, vecteurs viraux, ainsi que des modèles de souris transgéniques (Moore and Hogaboam, 2008). L'administration intra-trachéale de la bléomycine est le modèle animal de fibrose pulmonaire le plus couramment utilisé et le mieux caractérisé (Mouratis and Aidinis, 2011). La bléomycine est un agent anti-cancéreux qui a des propriétés pro-fibrosantes dans le poumon. En effet, le poumon présente une activité faible en bleomycin hydrolase qui permet normalement de dégrader cet antibiotique (Lazo and Humphreys, 1983). Ainsi, cet agent induit une mort massive des cellules épithéliales par apoptose et nécrose qui conduira au développement rapide d'une fibrose réversible chez la souris. L'administration unique de bléomycine intra-trachéale permet d'induire une fibrose pulmonaire transitoire mais une administration répétitive de la bléomycine imite plus efficacement l'aspect chronique de la fibrose pulmonaire, ainsi que d'autres caractéristiques, notamment la présence de cellules épithéliales alvéolaires hyperplasiques. Cependant, des travaux récents de *Decologne et al.* mettent en évidence chez la souris un modèle de fibrose pleurale et sous-pleurale qui reproduit d'autres aspects de la maladie. L'administration combinée de bléomycine et de particules de carbones chez les souris par injection intra-trachéale et/ou intrapleurale entraîne une

fibrose progressive dans les zones sous-pleurales de manière similaire à la FPI chez l'homme (Decologne et al., 2010).

VI. HYPOTHESE PHYSIOPATHOLOGIQUE : PERTURBATION DES INTERACTIONS EPITHELIO-MESENCHYMATEUSES

La physiopathologie de la FPI reste à ce jour méconnue. L'hypothèse physiopathologique communément reconnue à ce jour, est que la fibrose pulmonaire serait la conséquence d'une agression répétée de l'épithélium conduisant à une apoptose accrue des cellules épithéliales alvéolaires suivie d'un processus anormal de réparation.

1) Réactivation des voies du développement au cours de la fibrogenèse pulmonaire

Ainsi, la réparation alvéolaire normale après une agression met en jeu les interactions épithélium-fibroblastes et s'accompagnerait de la réactivation de phénomènes impliqués dans le développement pulmonaire fœtal (voie de signalisation SHH, WNT, HGF, FGF...). Des études récentes suggèrent qu'une anomalie des interactions épithélium-fibroblaste constituerait l'élément central des phénomènes conduisant à un remaniement de la matrice extracellulaire, à une accumulation exagérée de myofibroblastes résistant à l'apoptose dans les foyers fibroblastiques au cours du développement de la fibrose (King et al., 2011).

a) Voie sonic hedgehog (SHH)

Les homologues mammifères de la protéine Hedgehog de la Drosophile sont au nombre de trois : Indian Hedgehog (IHH), Desert Hedgehog (DHH) et Sonic Hedgehog (SHH). La voie de signalisation Hedgehog a été conservée au cours de l'évolution entre les invertébrés et les vertébrés (Beachy et al., 2010). Au cours du développement pulmonaire fœtal, *Shh* est exprimé selon un gradient disto-proximal dans l'épithélium des bourgeons. Son principal récepteur, *Patched* (*Ptc*) est exprimé par le mésenchyme

selon le même gradient (Bellusci et al., 1997). SHH est un facteur de croissance et de survie du mésenchyme pulmonaire fœtal. L'inactivation génique de *Shh* est létale et s'accompagne d'une diminution drastique de la prolifération mésenchymateuse, d'une augmentation de l'apoptose des cellules du mésenchyme, et d'une absence de ramification pulmonaire (Pepicelli et al., 1998). SHH possède également une action différenciatrice sur le mésenchyme en favorisant l'expression de marqueurs myocytaires (alpha-actine du muscle lisse, myosine) (Weaver et al., 2003).

Au niveau cellulaire, le cil primaire joue un rôle central dans la régulation de l'activation de la voie Hedgehog. Le cil primaire est décrit comme une antenne cellulaire dérivée du centrosome (corps basal). Cet organite cellulaire est formé de 9 doublets de microtubules. Contrairement aux cils motiles, le cil primaire est immobile car il ne possède pas de doublet central de microtubule (Ishikawa and Marshall, 2011). Les fibroblastes pulmonaires témoins et de fibrose en culture primaire présentent un cil primaire (Cigna et al., 2012).

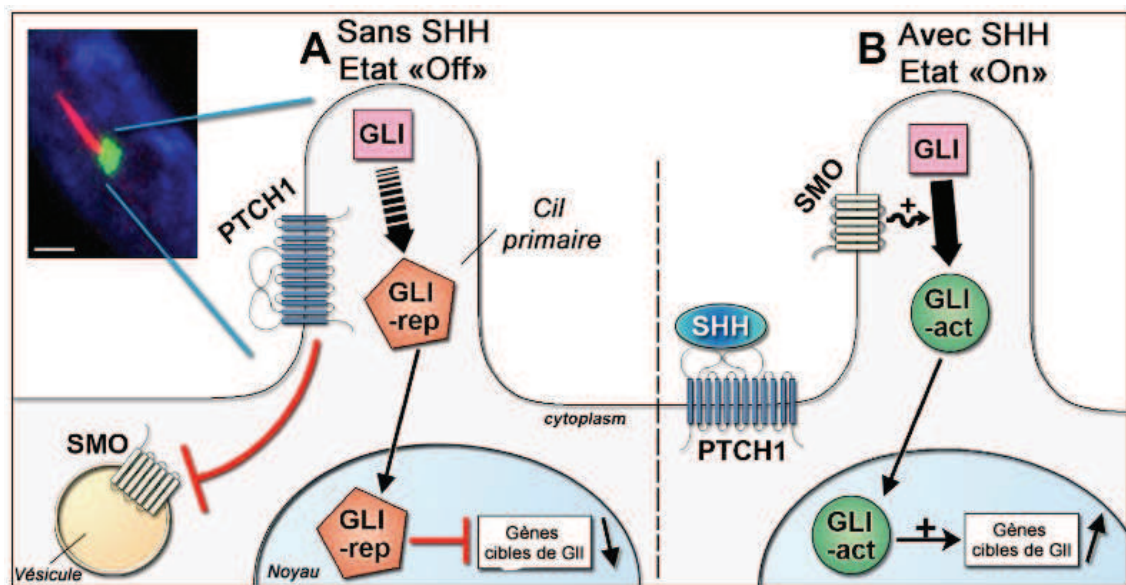


Figure 30: Modèle simplifié de la voie Sonic Hedgehog.
D'après (Mailleux et al., 2013).

Selon le modèle actuel, en absence de ligand, la protéine PTC est localisée dans le cil primaire et empêche la translocation de Smoothened (SMO) du cytoplasme vers le cil primaire. Les facteurs de transcriptions de la famille GLI sont alors sous forme de

répresseurs et vont inhiber la transcription de gènes cibles dans le noyau. La liaison du ligand SHH sur le récepteur PTC lève l'inhibition de PTC sur la protéine SMO et PTC va être exclu du cil. SMO va alors se transloquer dans le cil. La cascade de transduction ainsi déclenchée va activer les facteurs de transcription de la famille GLI (**figure 30**). Les GLI activateurs vont alors induire la transcription de leurs gènes cibles dans le noyau (Beachy et al., 2010). Des études ont aussi montré une réactivation de la voie SHH dans la fibrose pulmonaire chronique (Stewart et al., 2003) et dans la pneumopathie interstitielle non spécifique (Coon et al., 2006) où SHH est sécrété par les cellules épithéliales. Une étude récente de *Bolaños et al.* montrent que différents composants de la voie Shh sont surexprimés dans les poumons de FPI et les fibroblastes de FPI. SHH induit la prolifération, la synthèse de collagène, l'expression de fibronectine et la migration des fibroblastes (Bolanos et al., 2012). De plus, dans notre équipe, nous avons aussi montré que la voie SHH est réactivée dans les poumons de FPI. Nos résultats ont montré pour la première fois que la voie HH est nécessaire à la différenciation myofibroblastique induite par le TGF- β des fibroblastes pulmonaires témoins et de fibroses. Nous mettons ainsi en évidence que l'activation basale de SMO est indispensable à la différenciation myofibroblastique induite par le TGF- β dans les fibroblastes témoins. En revanche, l'activation basale de SMO n'est pas nécessaire à l'action du TGF- β sur les fibroblastes de fibroses, mais l'activation des GLI en aval est toujours requise (Cigna et al., 2012).

b) Voie Wnt/ β -caténine

Dans la voie de signalisation canonique *Wnt/ β -caténine*, la liaison du ligand Wnt à ses récepteurs de surface cellulaire nommés Frizzled va entraîner la stabilisation de la β -caténine puis sa translocation dans le noyau où elle va ensuite réguler l'expression de gènes cibles (Konigshoff and Eickelberg, 2010). Cette voie *Wnt/ β -caténine*, joue un rôle essentiel dans le développement, la régénération et le remodelage du poumon. Ce rôle essentiel dans la morphogenèse pulmonaire a été mis en évidence par l'excision du gène *β -caténine* dans les cellules épithéliales de souris par le système *CRE/loxP*. En effet, ces souris meurent à la naissance pour cause d'insuffisance respiratoire et montrent un tissu

pulmonaire composé principalement de voies aériennes proximales (Mucenski et al., 2003).

Plusieurs études montrent la surexpression de membres de la voie *Wnt* dans les cellules épithéliales alvéolaires et les fibroblastes pulmonaires de FPI (Konigshoff et al., 2008), (Konigshoff et al., 2009), (Vuga et al., 2009). De plus, des études récentes suggèrent l'implication d'une activation aberrante de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans la fibrose pulmonaire. En effet, l'équipe de *Dogliani* montre une forte accumulation nucléaire de β -caténine dans les cellules épithéliales alvéolaires hyperplasiques et les fibroblastes des foyers fibroblastiques des tissus pulmonaires de patients atteints de FPI. L'analyse des séquences d'ADN ne montre aucune anormalité affectant le gène β -caténine (Chilosi et al., 2003). De plus, chez la souris, l'inhibition de la voie *Wnt* par instillation intra-trachéale d'ARNi *β -caténine* réduit la synthèse de collagène, l'expression de TGF- β et atténue la fibrose pulmonaire induite par bléomycine (Kim et al., 2011).

c) Fibroblast Growth Factor (FGF)

Certains FGFs et leurs récepteurs jouent un rôle crucial dans les interactions épithélium-mésenchyme au cours du développement pulmonaire. Il s'agit des FGF7 (également nommé « keratinocyte Growth factor », KGF), FGF10 (également nommé KGF-2), FGF9 et FGF18. FGF7 exerce ses effets biologiques par l'intermédiaire du récepteur épithélial FGFR2b. FGF10 est capable de lier FGFR2b et un autre récepteur épithélial, FGFR1b. *In vivo*, dans le modèle murin, l'agénésie pulmonaire résultante de la perte de fonction de *Fgfr2b* ou de *Fgf10* démontre clairement que cette voie de signalisation est vitale dans la mise en place de l'arborescence bronchique. De plus, FGF9 (exprimé par le mésothélium et l'épithélium) régule la différenciation du mésenchyme au cours du développement pulmonaire. FGF18 est impliqué plus tardivement dans la phase d'alvéolarisation (Morrissey and Hogan, 2010).

Plusieurs études ont mis en évidence un rôle protecteur de FGF dans des modèles animaux de fibrose induite par la bléomycine. *Gupte et al.* ont montré que la surexpression de *Fgf10* dans l'épithélium alvéolaire de souris diminuait l'extension de la fibrose pulmonaire au cours des phases inflammatoires et fibrotiques (Gupte et al.,

2009). De même, *Sugahara et al.* ont montré que l'injection intra-trachéale de KGF humain chez le rat diminuait la fibrose pulmonaire (Sugahara et al., 1998). De plus, notre équipe a mis en évidence une dérégulation de la sécrétion de KGF par les fibroblastes pulmonaires provenant de patients atteints de FPI (Marchand-Adam et al., 2005). Il est décrit que la stimulation par IL-1 β augmente l'expression et l'activation de c-Jun et la sécrétion de KGF dans les fibroblastes. Cependant, dans cette étude, les fibroblastes de FPI stimulés par l'IL-1 β ne montraient pas d'augmentation et d'activation de c-Jun, ni d'augmentation de sécrétion de KGF en comparaison avec les fibroblastes pulmonaires de patients témoins.

A l'inverse, *Coffey et al.* observent une contribution de FGF9 dans la progression de la fibrose. Dans cette étude, les auteurs observent une surexpression de FGF9 dans les myofibroblastes des foyers de fibrose et dans l'épithélium hyperplasiques de poumons humains FPI en comparaison aux poumons témoins, ainsi que dans les fibroblastes isolés de poumons humains traités avec le TGF- β 1 (Coffey et al., 2013). Le FGF9 aurait plutôt une action pro-fibrosante.

d) Hepatocyte Growth factor (HGF)

Le HGF joue un rôle essentiel dans le développement pulmonaire et en particulier dans l'alvéologenèse (Ware and Matthay, 2002), (Padela et al., 2005). *In vivo*, un modèle d'agression pulmonaire chez le rat nouveau-né a mis en évidence le rôle clé de l'HGF et de son récepteur c-Met dans le processus d'alvéologenèse (ce processus est post-natal chez les rongeurs) (Padela et al., 2005). L'expression de l'HGF et de son récepteur était induite en réponse à l'hyperoxie. De plus, des rats nouveau-nés injectés avec un anticorps bloquant anti-HGF en conditions normoxique présentaient un défaut de septation secondaire par rapport aux rats contrôles.

L'HGF est un membre de la famille des plasminogen-related growth factor et est synthétisé sous forme inactive proHGF. En réponse à une lésion tissulaire, le pro-HGF va être converti en forme active HGF. L'HGF est activé entre autre par la serine protéase HGFA (« HGF activator »). Cette protéase peut être inhibée par HAI-1 et HAI-2 qui ont la capacité de lier et de bloquer l'activation de l'HGF par HGFA (Crestani et al., 2012).

Dans les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique, un niveau élevé de HGF a été observé dans les lavages broncho alvéolaires en comparaison aux patients témoins. Par contre, les fibroblastes pulmonaires de FPI montrent in vitro une production réduite d'HGF et un défaut dans l'activation du proHGF (Marchand-Adam et al., 2003), (Marchand-Adam et al., 2006). Ces défauts d'activation et de production d'HGF semblent être un déséquilibre de l'expression d'HGFA, HAI-1 et HAI-2 en condition fibrotique. En effet, in vitro les fibroblastes de FPI ont une faible capacité à activer le pro-HGF en lien avec un niveau d'expression faible d'HGFA et un niveau élevé de l'expression d'HAI-1 et d'HAI-2. De plus, il a aussi été mis en évidence une dérégulation de la balance de l'expression d'HGFA, HAI-1 et HAI-2 dans les lavages broncho alvéolaires au cours des phases fibrotiques dans des modèles murins de fibrose induite par la bléomycine (Phin et al., 2010).

Ces études sur l'expression des gènes des voies du développement dans la FPI et les modèles animaux associés suggèrent que la fibrose pulmonaire idiopathique est caractérisée par une dérégulation des voies du développement et que ces anomalies pourraient entraîner une dérégulation des interactions épithélium-fibroblaste.

2) Autres médiateurs impliqués dans la fibrose

a) Les facteurs impliqués dans la régulation de la matrice extracellulaire (MEC)

L'augmentation des liaisons covalentes de la matrice extracellulaire affecte la fibrogenèse et la pathogenèse de la FPI de plusieurs façons. Premièrement, les enzymes qui régulent la composition de la matrice extracellulaire et le pontage covalent biochimique modifient les réponses des cellules en contrôlant la séquestration et la disponibilité des facteurs de croissance. Deuxièmement, la rigidité de la matrice extracellulaire affecte directement le phénotype cellulaire via des tractions, indépendamment de sa composition, induisant l'activation directe des myofibroblastes (Huang et al., 2012) et du TGF- β (Hinz, 2009).

(i) Lysyl oxidase-like (LOXL2)

La lysyl oxidase-like (LOXL2) est une protéine de pontage qui joue un rôle important dans la formation et la réparation de la matrice extracellulaire, en initiant les premières étapes de liaison entre le collagène et l'élastine permettant de stabiliser les protéines fibreuses (Kagan and Li, 2003). L'équipe de *Barry-Hamilton* a montré *in vivo* que l'inhibition de LOXL2 dans les souris traitées à la bléomycine, diminue la fibrose pulmonaire via la régulation de la liaison du collagène et de la rigidité de la matrice extracellulaire. En effet, les auteurs montrent dans ses souris que l'inhibition de LOXL2 par un anticorps monoclonal AB0023 développé par *Rodriguez et al.* (Rodriguez et al., 2010) diminue les fibroblastes activés, l'épaississement alvéolaire (desmoplasie, cellules endothéliales), la production de facteurs de croissance (Endothéline-1) et de cytokines (CXCL12), ainsi que la voie de signalisation du TGF- β 1 (Barry-Hamilton et al., 2010).

(ii) Transglutaminase 2 (TGM2)

De manière similaire, la TGM2 joue un rôle déterminant dans la stabilisation de la matrice et le pontage covalent des protéines par transamination (échange d'un groupement amine NH_2 et d'un groupement oxygène). Sous traitement à la bléomycine, les souris *Tgm2*^{-/-} montrent une diminution de la fibrose et de l'accumulation de collagène et de fibronectine en comparaison aux souris contrôles. Dans les biopsies pulmonaires humaines de FPI, l'expression et l'activation de TGM2 est augmentée par rapport aux biopsies de patients témoins. *In vitro*, la surexpression de TGM2 dans les fibroblastes pulmonaires humains augmente le dépôt de fibronectine tandis que son inhibition entraîne des défauts d'adhésion et de contraction de la MEC. Et enfin, le traitement des fibroblastes par le TGF- β entraîne une augmentation de TGM2 à la membrane, augmentant son activité enzymatique (Olsen et al., 2011).

b) Voie de la sérotonine (5-hydroxytryptamine)

La voie de la sérotonine (5-hydroxytryptamine; 5-HT) a aussi été identifiée comme une voie de signalisation impliquée dans la fibrose pulmonaire. La 5-HT contrôle l'activation et la prolifération des fibroblastes via l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} et

5-HT2B. Les récepteurs 5-HTR2A et 5-HTR2B sont fortement exprimés par les fibroblastes des foyers de fibrose dans les échantillons humains de FPI. 5-HTR2A est fortement exprimé par les cellules épithéliales alvéolaires tandis que 5-HTR2B est plus fortement exprimé dans les fibroblastes pulmonaires. De plus, l'inhibition de 5-HTR2A/B par des inhibiteurs pharmacologiques atténue la fibrose pulmonaire et réduit l'expression du collagène au niveau des ARNm et de la protéine dans les souris traitées à la bléomycine (Fabre et al., 2008), (Konigshoff et al., 2010). *In vitro*, l'inhibition d'HTR2A/B bloque la production de collagène induite par le TGF- β dans les fibroblastes pulmonaires humains (Konigshoff et al., 2010).

c) MicroARNs non codant

Les microARNs sont des petits ARN non codants qui répriment ou activent spécifiquement l'expression d'un ensemble de gènes cibles apparentés. Des travaux récents apportent la preuve que ces microARNs sont des modulateurs de la fibrose dans plusieurs organes, y compris le poumon (Pandit et al., 2011), (Milosevic et al., 2012), (Jiang et al., 2010). En 2012, *Milosevic et al.* mettent en évidence une surexpression de miR-154 dans les fibroblastes de FPI (Milosevic et al., 2012). Les auteurs mettent en évidence le rôle de miR-154 dans la régulation de la prolifération et la migration des fibroblastes. De plus, il a été montré que le TGF- β , principal médiateur profibrotique régule l'expression de microARNs induisant l'activation de programmes transcriptionnels fibrotiques. Et enfin, *Milosevic et al.* observent que le profil des microARNs des poumons de FPI est similaire à celui du poumon embryonnaire humain, montrant une fois de plus la réactivation des programmes de développement au cours de la fibrogenèse pulmonaire (Milosevic et al., 2012).

VII. HYPOTHESE PHYSIOPATHOLOGIQUE: PARADOXE DE L'APOPTOSE DANS LA FPI

La régulation de l'apoptose joue aussi un rôle crucial dans l'homéostasie alvéolaire et dans les processus normaux de réparation alvéolaire après une agression. De nombreux travaux suggèrent qu'une perturbation de la balance apoptotique constituerait un des phénomènes centraux conduisant au développement de la fibrose

pulmonaire (Selman and Pardo, 2006). L'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires participe à la perturbation de l'intégrité de la membrane basale et au recrutement des fibroblastes au cours de la fibrose pulmonaire. Comme il a été décrit dans le chapitre I, l'apoptose peut être induite par les voies intrinsèques ou extrinsèques (**figure 31**).

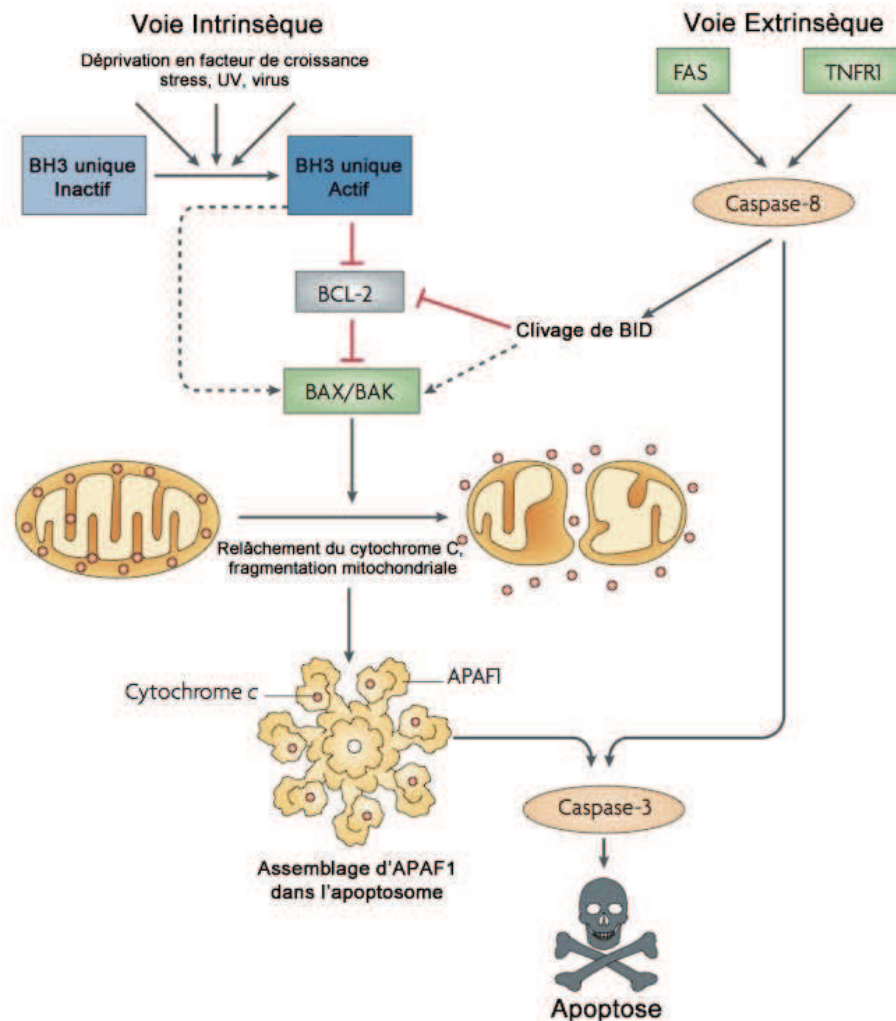


Figure 31 : Schéma simplifié des voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose.
D'après (Youle and Strasser, 2008).

Brièvement (**voir chapitre I pour plus de détails**), l'activation de la voie extrinsèque peut-être induite par la liaison des récepteurs de mort à la surface de la cellule comme Fas/FasL et TNFR1/TNF- α aboutissant à l'activation de la cascade des caspases mettant en jeu l'activation de la caspase-8 initiatrice, aboutissant à la mort cellulaire. La voie intrinsèque induite par un stress intracellulaire peut être induite par divers stimuli comme le détachement de la matrice extracellulaire (Anoïkis), des agents

génotoxiques (déprivation en facteur de croissance, ultraviolets (UV), virus) pouvant mettre en jeu l'activation de P53, le stress oxydant, ou encore le stress du réticulum endoplasmique. Il est à noter que le stress du réticulum endoplasmique peut aussi activer la voie extrinsèque de l'apoptose. Cette voie mitochondriale est régulée par les protéines de la famille BCL-2 qui comprend les anti-apoptotiques, les pro-apoptotiques modulateurs BH3-only et les pro-apoptotiques effecteurs dont BAX et BAK. Cette voie mitochondriale active la cascade des caspases via l'activation de la caspase-9 initiateur dans le complexe apoptosome menant à l'apoptose cellulaire. Les caspases activées peuvent être régulées négativement par les protéines de la famille des inhibiteurs de l'apoptose (IAPs) dont XIAP, cIAP1, cIAP2 ou encore la survivine. L'activité des protéines anti-apoptotiques IAPs est contre-réglée par les seconds activateurs des caspases dérivés de la mitochondrie Smac/DIABLO. Enfin, un croisement entre les voies intrinsèques et extrinsèques peut aussi avoir lieu via la caspase-8 qui va cliver le BH3-only BID activant à son tour la voie intrinsèque de l'apoptose.

1) Sensibilité accrue à l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires

Une augmentation de l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires de type II à proximité des foyers fibroblastiques (Uhal et al., 1998) et même dans les territoires d'apparence « saine » dans les poumons de patients avec une FPI/UIP (Barbas-Filho et al., 2001) avait été mise en évidence en microscopie électronique et la technique du TUNEL.

a) Augmentation des marqueurs et des régulateurs de l'apoptose dans la FPI

L'augmentation de l'expression de marqueurs et de régulateurs de l'apoptose a été mise en évidence dans les cellules épithéliales alvéolaires des tissus pulmonaires humains de FPI. *Kuwano et al.* mettent en évidence la corrélation entre l'augmentation de l'apoptose et l'augmentation de l'expression de P53 et P21 dans les cellules épithéliales alvéolaires localisées à proximité des régions fibrotiques dans le poumon humain (Kuwano et al., 1996). De plus, *Pataki et al.* observent une augmentation de

l'expression de P53, P21, BAX et de la caspase-3 et une diminution de BCL-2 dans les cellules épithéliales hyperplasiques suggérant que cette augmentation de l'expression des marqueurs pro-apoptotiques dans l'épithélium hyperplasique pourrait être impliqué dans une re-épithélialisation inappropriée et retardée (Plataki et al., 2005). Il a été suggéré que cette surexpression de P53 pouvait être due à une diminution de sa dégradation par le protéasome via son interaction avec la protéine MDM2 (Mouse double minute 2 homolog) (Nakashima et al., 2005). En effet, *Nakashima et al.* observent une augmentation de P53 phosphorylé (en serine 15) et de P53 ubiquitinylé mais une diminution de l'association P53-MDM2 dans les cellules épithéliales de poumons provenant de patients atteints de FPI par rapport aux poumons témoins. Cependant, il faut noter que P21 et P53 peuvent être aussi considérés comme des marqueurs de la sénescence cellulaire (Kuilman et al., 2010). De plus, les travaux d'*Inoshima et al.* mettent en évidence les effets anti-apoptotiques et anti-fibrosant de la surexpression de P21 dans les cellules épithéliales alvéolaires dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induit par la bléomycine (Inoshima et al., 2004). En effet, *Inashima et al.* montrent que l'augmentation de l'expression de *p21* par adénovirus, 7 jours après l'administration intra-trachéale de bléomycine dans les souris C57BL/6, diminue l'apoptose des cellules épithéliales, l'inflammation pulmonaire ainsi que la fibrose au 14^{ème} jour. En effet, les auteurs observent une diminution du nombre de cellules épithéliales apoptotiques, des lymphocytes et du collagène I suggérant plutôt une implication de P21 dans la sénescence des cellules épithéliales alvéolaires (une cellule sénescence est plus résistante à l'apoptose).

(i) Rôle des protéines de la famille BCL-2 dans la fibrose

En plus de ce déséquilibre de l'expression de BAX et de BCL-2 dans les cellules épithéliales alvéolaires des patients FPI observé par *Plataki et al.* (Plataki et al., 2005), il a été montré que BID un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 était impliqué dans l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires et la fibrose induite par la bléomycine ou le TGF- β 1 chez la souris. En effet, les cellules épithéliales alvéolaires pulmonaires des souris *Bid*^{-/-} sont résistantes à l'apoptose induite par le TGF- β 1

(Budinger et al., 2006). De plus, il a été montré dans des modèles murins de fibrose induit par le TGF- β 1 ou la bléomycine, l'implication de Bax dans la pathogenèse de la fibrose pulmonaire (Kang et al., 2007). Dans ce modèle, les souris *Bax*^{-/-} sont protégées de la fibrose, impliquant une diminution de l'apoptose et de l'inflammation. En effet, les cellules du lavage broncho alvéolaires et le collagène induit par le TGF- β 1 sont diminués dans les souris *Bax*^{-/-} par rapport aux sauvages. De plus, les souris TGF- β 1 transgéniques montrent une augmentation du niveau d'expression de l'ARNm et de la protéine BAX par rapport aux souris sauvages suggérant que le TGF- β 1 régule l'expression de Bax. De plus, dans cette étude, les auteurs montrent que le TGF- β 1 régule de manière négative MMP-12 et p21 via des mécanismes dépendant de Bax et Bid.

b) Voie de signalisation Fas

Il a été suggéré qu'une suractivation de la voie de signalisation Fas/Fas ligand était également impliquée dans l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires dans les patients de FPI. *Golan-Gerstl et al.* montrent par immunofluorescence, une surexpression de la molécule de surface FasL dans les myofibroblastes provenant de poumons de patients atteints de FPI (Golan-Gerstl et al., 2007). De plus, les auteurs montrent que les myofibroblastes positifs pour Fas ligand peuvent induire l'apoptose des cellules épithéliales par la voie dépendante de Fas dans un modèle de souris induit par la bléomycine. En effet, in vivo, dans les poumons de fibrose induit par la bléomycine, l'apoptose des cellules épithéliales est associée à la surexpression de Fas et de gènes impliqués dans la voie de signalisation apoptotique par ces cellules, ainsi qu'à la surexpression de FasL à leur surface des myofibroblastes α -SMA positifs. Au contraire, les myofibroblastes déficients en FasL ne sont pas capables d'induire l'apoptose des cellules épithéliales pulmonaires de souris in vitro et in vivo. Ces travaux mettent en évidence un rôle actif des myofibroblastes dans l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires via Fas contribuant à la progression de la pathogenèse de la FPI. *Hagimoto et al.* ont montré in vivo que l'activation par liaison Fas/Fas ligand induisait une apoptose et une inflammation excessive qui favorisait la fibrose pulmonaire dans les souris (Hagimoto et al., 1997). En effet, les auteurs ont mis en évidence que l'inhalation répétée d'anticorps anti-Fas mimant la liaison Fas/Fas ligand induisait une

apoptose et une augmentation des lymphocytes, neutrophiles et des macrophages dans les LBA, ainsi qu'une augmentation de collagène I. De plus, ces souris montrent aussi une augmentation de l'expression de l'ARNm *TGF-β* par rapport aux souris contrôles qui ont inhalées l'anticorps contrôle isotype. Enfin, ils montrent aussi, que le TGF-β1 favorise l'apoptose des cellules épithéliales induit par Fas via l'activation de la caspase-3 in vitro et in vivo (Hagimoto et al., 2002). En effet, in vitro l'inhibiteur de la caspase-3 (Z-VAD.FMK) inhibe l'apoptose induite par le TGF-β1 dans les cellules épithéliales bronchiolaires humaines. In vivo, l'augmentation de l'expression de la caspase-3 clivée est détectée dans les cellules épithéliales alvéolaires dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induit par la combinaison de Fas et TGF-β1.

c) Stress oxydant

De récents travaux suggèrent que le stress oxydatif contribue aussi à la progression de la FPI. En effet, plusieurs études montrent un déséquilibre oxydant/antioxydant avec l'augmentation du niveau de produits du stress oxydant comme le peroxyde d'oxygène (H_2O_2) et l'isoprostane-8 (Psathakis et al., 2006), (Rahman et al., 2006) et la diminution d'antioxydants comme le glutathione (GSH) et la dismutase superoxyde dans la FPI (Beeh KM 2002 (Beeh et al., 2002), (Rahman et al., 2006).

La source principale des espèces réactives d'oxygènes dans le poumon sont les cellules inflammatoires comme les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages (Kinnula et al., 1995), mais aussi les cellules épithéliales alvéolaires, bronchiques (Kinnula et al., 1992) et endothéliales (Holland et al., 1990).

Cependant, les myofibroblastes peuvent aussi produire du peroxyde d'oxygène qui peut à son tour induire l'apoptose des cellules épithéliales (Waghray et al., 2005). En effet, Waghray *et al.* ont mis en évidence, en co-culture l'apoptose des petites cellules épithéliales alvéolaires (small airway epithelial cells) induite par la production d' H_2O_2 provenant de fibroblastes isolés de poumons de patients atteints de FPI en présence de TGF-β1. De plus, Wallach-Dayana *et al.* ont montré in vitro que la bléomycine pouvait induire l'apoptose des MLE-15 (Cellules épithéliales alvéolaires pulmonaires murines) par une augmentation du niveau des ROS, associé avec une augmentation de la caspase-8 et de l'activité de la caspase-9, indépendamment de la voie Fas/FasL (Wallach-Dayana

et al., 2006). En effet, le GHS et des inhibiteurs de la caspase-8 et de la caspase-9 mais pas du FasL inhibent ces effets. Cependant, un rôle protecteur des ROS dans l'apoptose des macrophages pulmonaires dans un modèle murin de fibrose a aussi été mis en évidence. Dans ces macrophages alvéolaires, il a été mis en évidence une résistance à l'apoptose de ces cellules induite par la bléomycine via l'activation de P53 par l'oxyde nitrique (NO) (Davis et al., 2000).

Il faut noter que les ROS peuvent aussi avoir des conséquences sur les fibroblastes. Les espèces réactives d'oxygène (ROS) sont des agents nocifs pour les cellules épithéliales et les fibroblastes pulmonaires. Les protéines NADPH oxydase (NOX) génèrent des ROS, nommées superoxyde par transfert d'électron de l'oxygène. Le superoxyde peut être converti en hydrogène peroxyde par les dismutases superoxydes cellulaires. Les protéines NADPH oxydase sont des sous-unités cytosoliques et associées à la membrane. L'expression de NOX4/NADPH oxydase est augmentée dans les fibroblastes pulmonaires humains de FPI. La NOX4/NADPH oxydase est nécessaire à la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes sous TGF- β 1 et à la migration des fibroblastes en présence PDGF (Amara et al., 2010). Ainsi, les myofibroblastes jouent aussi un rôle actif dans la mort des cellules épithéliales via la production des ROS.

d) Activité télomérase

L'activité télomérase peut aussi être impliquée dans l'apoptose des cellules épithéliales. Les télomérases sont des ribonucléoprotéines (assemblage d'ARN et de protéines) qui catalysent l'addition d'une séquence répétée spécifique à l'extrémité des chromosomes.

Driscoll et al. ont mis en évidence que l'expression et l'activité des télomérases était essentiel à la prolifération et à la réparation des cellules épithéliales alvéolaires (Driscoll et al., 2000). Des mutations des télomérases ainsi qu'un raccourcissement des télomères a été identifié dans des formes familiales et non familiales de FPI (Armanios et al., 2007), (Cronkhite et al., 2008). Une étude de 2005 sur des femmes montre que le raccourcissement des télomères peut être lié au tabagisme qui peut être un facteur de risque pour la FPI. En effet, cette étude montrent que les télomères des cellules épithéliales alvéolaires chez les fumeuses sont plus courts que chez les non fumeuses,

en association avec l'âge (Valdes et al., 2005). Le raccourcissement des télomères peut causer des dommages à l'ADN qui peuvent induire la mort cellulaire (Mondello and Scovassi, 2004). En accord avec ces résultats, il a été observé que l'activité de la télomérase était inversement corrélée avec l'augmentation de l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires provenant de patients atteints de FPI (Waisberg et al., 2010) et dans les modèles murins de fibrose pulmonaires induits par la bléomycine (Fridlender et al., 2007).

Ces études suggèrent que l'expression des télomérases pourrait être un marqueur potentiel pour l'identification des patients ayant un risque augmenté pour développer une FPI. En effet, l'expression des télomérases pourrait donc être un marqueur pour identifier les cellules qui se régénèrent et empêchent le vieillissement prématuré du poumon.

e) Le stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est impliqué dans plusieurs fonctions essentielles à la cellule comme le repliement des protéines membranaires et sécrétées, la synthèse des lipides ou encore l'homéostasie du calcium (Lin et al., 2008). Le stress du RE est induit en réponse à des perturbations dans la synthèse et le repliement des protéines, entraînant une accumulation de protéines mal pliées dans le RE et l'activation de l'UPR (unfolded protein response). La principale fonction de l'UPR est de prévenir la mort cellulaire en contrôlant le repliement et l'accumulation de protéines mal pliées qui pourraient s'agréger et interférer avec les fonctions cellulaires fondamentales (Zhang and Kaufman, 2006). Les premières observations faisant le lien entre le stress du RE et la FPI ont été faites dans des cas de pneumopathie interstitielle familiale (FIP), dans une famille avec une mutation du gène *SFTPC* codant pour la protéine surfactant C (SP-C) (Nogee et al., 2001), (Thomas et al., 2002). Depuis, il a aussi été observé des mutations de *SFTPA2*, un des deux isoformes de la protéine surfactant A, dans une FIP (Wang et al., 2009). Des études ultérieures impliquant des biopsies pulmonaires humaines ont montré que les marqueurs du stress du RE étaient très augmentés dans l'épithélium alvéolaire de FPI et de FIP (Korfei et al., 2008), (Lawson et al., 2008). En effet, il a été observé une augmentation de l'expression du niveau des protéines médiatrices du stress du RE comme ATF-6, ATF-4 et CHOP-2 ainsi qu'une

augmentation de l'ARNm *XBP-1* dans les homogénats pulmonaires et les cellules épithéliales alvéolaires provenant de poumons FPI (Korfei et al., 2008). De plus, BAX et la caspase-3 clivée ont été détectées dans ces cellules épithéliales alvéolaires présentant un stress du RE dans les poumons de FPI. Des études chez la souris ont montré que l'induction du stress du RE dans l'épithélium alvéolaire favorisait la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Lawson et al., 2011). Une augmentation de l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires était observée dans ce modèle. En effet, *Lawson et al.* ont développé un modèle transgénique de souris qui exprime de manière conditionnelle le mutant L188Q *SFTPC* exclusivement dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II. A l'âge adulte l'expression de L188Q *SFTPC* dans ces souris entraîne un stress du RE dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II, mais les auteurs n'observent aucune évidence d'augmentation de l'apoptose dans les poumons ni de fibrose à l'état basal. Cependant, de faibles doses de bléomycine augmentaient la mort cellulaire des cellules épithéliales alvéolaires par apoptose ainsi que la fibrose pulmonaire dans les souris mutantes L188Q *SFTPC*.

L'ensemble de ces travaux mettent en évidence une très grande variété de processus menant à la mort des cellules épithéliales alvéolaires au cours de la fibrose pulmonaire dans lesquels les myofibroblastes semblent jouer un rôle actif.

2) Résistance des fibroblastes et myofibroblastes à l'apoptose

L'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires participe à la perturbation de l'intégrité de la membrane basale et au recrutement des fibroblastes. L'accumulation continue de fibroblastes et de myofibroblastes qui synthétisent et déposent du collagène et des composés de la MEC à l'intérieur des lésions de fibrose est une des caractéristique de la dérégulation des processus de cicatrisation impliquée dans la pathogenèse de la FPI. Au cours de la réparation normale d'une plaie, le nombre de fibroblastes et de myofibroblastes est réduit par apoptose en fin de cicatrisation (Desmouliere et al., 1995), en revanche plusieurs études montrent une absence d'apoptose dans les foyers fibroblastiques, et une résistance des fibroblastes de FPI à

l'apoptose. L'absence d'apoptose des fibroblastes de FPI suggère que la résistance à l'apoptose est un des mécanismes qui contribue à la persistance inappropriée des fibroblastes dans la FPI. Cette accumulation de myofibroblastes dans les foyers fibroblastiques des biopsies pulmonaires est fortement corrélée avec l'augmentation de la mortalité chez les patients atteints de FPI. Ce déséquilibre entre la résistance des fibroblastes et la plus grande sensibilité des cellules épithéliales face à la mort cellulaire est appelé « paradoxe de l'apoptose » de la FPI.

Comme il a été décrit dans le paragraphe précédent, de nombreuses études mettent en évidence l'implication des marqueurs et des régulateurs de l'apoptose dans la pathogenèse de la FPI principalement dans l'apoptose des cellules épithéliales. De la même manière des études ont mis en évidence l'implication de ces marqueurs et régulateurs apoptotiques dans la résistance des fibroblastes à l'apoptose.

a) Dérégulation des médiateurs solubles

(i) Implication du TGF- β 1 : effet anti-apoptotique sur les fibroblastes

En plus, de son rôle dans l'induction de la différenciation myofibroblastique, le TGF- β favorise aussi la survie des myofibroblastes, en empêchant leur apoptose induite par l'IL-1 β . En effet, il a été montré que l'IL-1 β inhibe l'expression d' α -SMA tout en induisant l'apoptose des myofibroblastes pulmonaires de rats de manière sélective via l'induction d'oxyde nitrique synthase (NOS pour nitric oxide synthase) (Zhang et al., 1997). L'apoptose des myofibroblastes induite par IL-1 β peut être inhibée par le TGF- β 1 par deux mécanismes, la suppression de l'expression d'iNOS (inducible NOS) et en empêchant la baisse du niveau d'expression de BCL-2. Dans cette étude, les auteurs n'observent pas un changement du niveau d'expression de BAX (Zhang and Phan, 1999). Il a aussi été mis en évidence que le TGF- β 1 pouvait induire une résistance des fibroblastes pulmonaires foetaux humains de culture primaire à l'anoïkis, en activant la protéine kinase FAK (focal adhesion kinase) via l'activation des voies de signalisation Smad3, PI3K/Akt (phosphatidylo-inositol 3 kinase) et MAPK P38 (p38 mitogen-activated protein kinase). La protéine kinase FAK favorise la survie des cellules

(Horowitz et al., 2007). De plus, l'administration de mésylate d'imatinib, un inhibiteur des protéines kinases qui module l'activité de ces voies de survie cellulaire atténue la fibrose pulmonaire dans un modèle de souris induit par la bléomycine (Vittal et al., 2007).

Ces travaux suggèrent un rôle additionnel de la molécule pro-fibrosante TGF- β 1 dans la progression de la pathogenèse de la FPI. En effet, TGF- β 1 va induire la différenciation des fibroblastes et myofibroblastes et va ensuite contribuer à leur résistance à l'apoptose.

(ii) Endothéline-1 (ET-1) effet anti-apoptotique sur les fibroblastes

L'ET-1 est un médiateur soluble impliqué dans la fibrogenèse, notamment en induisant la migration et la prolifération des fibroblastes et leur différenciation en myofibroblastes. Le niveau d'expression d'ET-1 est augmenté dans les tissus pulmonaires et les lavages broncho alvéolaires (LBA) de FPI (Swigris and Brown, 2010), ainsi que dans les modèles murins de fibrose pulmonaire (Mutsaers et al., 1998). Il a été montré que l'ET-1 pouvait induire la résistance des fibroblastes à l'apoptose à travers la surexpression des IAPs comme la survivine ou XIAP sous apoptose induite par Fas (Sisson et al., 2012), (Ajayi et al., 2013). De plus, il a été montré que l'ET-1 pouvait favoriser la résistance à l'apoptose des fibroblastes pulmonaires de FPI et témoins via les voies de signalisation de survie PI3K/AKT de manière dépendante de p38 MAPK (Kulasekaran et al., 2009). ET-1 pouvait aussi agir via FAK dans ces fibroblastes pulmonaires pour diminuer leur sensibilité à l'apoptose (Sisson et al., 2012). Ces mêmes auteurs ont montré in vivo que le TGF- β 1 de manière indépendante de l'ET-1 pouvait favoriser la résistance des fibroblastes à l'apoptose induite par Fas via PI3K/AKT et FAK respectivement.

Ces résultats suggèrent que de la même manière que le TGF- β 1, l'endothéline joue un rôle essentiel dans la progression de la fibrose en contribuant à l'activation et à la résistance des fibroblastes à l'apoptose entraînant leur accumulation dans les foyers fibroblastiques.

(iii) Cytokines pro-inflammatoires : effet pro-apoptotique sur les fibroblastes

Les fibroblastes de FPI montrent une résistance à l'apoptose induite par la liaison de FasL à son récepteur de mort à la surface cellulaire (Fas) (Moodley et al., 2004). Par contre, une exposition préalable au TNF- α et à l'IFN- γ rend les fibroblastes et les myofibroblastes pulmonaires humains différenciés par le TGF- β 1 extrêmement sensibles à l'apoptose induite par Fas contrant ainsi l'effet de survie induit par le TGF- β 1 (Frankel et al., 2006).

Une étude récente montre que le TNF- α et à l'IFN- γ augmentent l'expression de Fas à la surface cellulaire et que cela favorise la sensibilisation des fibroblastes pulmonaires humains à l'apoptose induite par Fas (Wynes et al., 2011). Ces mêmes auteurs montrent aussi par marquage immunohistochimique sur coupes de poumons provenant de patients atteints de FPI, que Fas est exprimé faiblement par les fibroblastes et les myofibroblastes dans les foyers fibroblastiques. Ces résultats suggèrent une importance de la présence des cytokines pro-inflammatoires dans l'initiation de l'apoptose des fibroblastes induit par Fas.

(iv) Prostaglandine E2 (PGE2)/Cyclooxygénase (COX2) : effet pro-apoptotique sur les fibroblastes

D'autres études montrent aussi un effet similaire de la PGE2 dans l'apoptose des fibroblastes que celle induite par Fas (Huang et al., 2009), (Maher et al., 2010). La PGE2 est un médiateur anti-fibrotique produit par les fibroblastes pulmonaires et qui joue un rôle bénéfique dans la résolution des maladies pulmonaires fibrosantes. La PGE2 a la capacité de limiter plusieurs caractéristiques pathologiques des fibroblastes et des myofibroblastes pulmonaires, dont la prolifération, la migration (Li et al., 2011b), la sécrétion de collagène des fibroblastes et la différenciation myofibroblastique (Thomas et al., 2007) induite par le TGF- β (Kolodsick et al., 2003). En effet, la PGE2 inhibe la sécrétion de collagène et l'expression d'ACTA2.

La PGE2 est produite à partir d'acide arachidonique endogène via la voie cyclooxygénase (COX). Il existe deux isoformes de la COX, COX-1 qui est exprimé de

manière constitutive et COX-2 qui est induite par des stimuli inflammatoires, comme le TGF- β , le TNF- α ou l'IL-1 β (Bozyk and Moore, 2011). Le niveau d'expression de PGE2 est réduit dans les poumons de patients atteints de FPI. Cette diminution est due à une capacité diminuée des fibroblastes de FPI à exprimer COX-2 et donc à synthétiser PGE2 et à (Wilborn et al., 1995), (Keerthisingam et al., 2001). De plus, l'identification récente des changements épigénétiques ont permis d'expliquer cette inhibition de la production de prostaglandine dans les tissus pulmonaires fibrotiques (Coward et al., 2009), (Huang et al., 2010). La diminution de l'expression de COX-2 dans les fibroblastes de FPI est due à une hypoacétylation des histones (Coward et al., 2009).

Les fibroblastes de fibroses présentent aussi un défaut de réponse à la PGE2. Dans les fibroblastes de fibrose pulmonaire humains et de souris, l'hyperméthylation du promoteur du gène récepteur 2 à la prostanglandine E (PTGER2) est responsable d'une diminution du niveau d'expression de la production du gène, EP2 (E-prostanoid receptor) (Huang et al., 2010).

De plus, il a été montré que la déficience en PGE2 entraînait des effets opposés sur la sensibilité des fibroblastes et des cellules épithéliales alvéolaires pulmonaires à l'apoptose induite par Fas (Maher et al., 2010). En effet, les auteurs observent in vitro, que l'administration de PGE2 inhibe l'apoptose induite par Fas des cellules épithéliales alvéolaires de type II, mais active l'apoptose des fibroblastes provenant de poumons de patients atteints de FPI. De plus, les auteurs observent que le PGE2 inhibe la phosphorylation d'Akt dans les fibroblastes pulmonaires normaux et de FPI, suggérant que la régulation de cette protéine kinase de survie est un mécanisme impliqué dans les réponses cellulaires apoptotiques modulées par PGE2.

Ces résultats montrent que la PGE2 participerait au paradoxe de l'apoptose dans le FPI. Ainsi, un défaut en PGE2 favoriserait l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires et la survie des fibroblastes de FPI en diminuant leur apoptose.

b) Dérégulation des inhibiteurs de l'apoptose

Récemment, il a été montré que l'augmentation de l'expression des IAPs comme la SURVIVINE et XIAP contribue à la résistance des fibroblastes de FPI à l'apoptose. La SURVIVINE (nommé aussi BIRC5) est le membre le plus petit de la famille des IAPs chez les mammifères avec un seul domaine BIR. Elle joue un rôle essentiel dans la

progression du cycle cellulaire et au cours du développement embryonnaire. Cependant, dans les cellules adultes, la SURVIVINE n'est exprimée qu'au cours de la division cellulaire (Altieri, 2010). Dans deux études, il a été reporté qu'une partie des fibroblastes provenant de poumons FPI montrait une augmentation de l'expression de ces IAPs par rapport aux fibroblastes provenant de poumons normaux. L'inhibition de l'expression de ces IAPs dans ces fibroblastes de FPI augmentait leur sensibilité à l'apoptose induite par Fas (Sisson et al., 2012), (Ajayi et al., 2013).

Dans la première étude (Sisson et al., 2012), l'ensemble des fibroblastes pulmonaires de FPI étaient résistants à l'apoptose induite par Fas. Cependant l'inhibition de la survivine ou de XIAP augmentait l'apoptose induite par Fas de seulement la moitié des fibroblastes de FPI étudiés. Ces résultats suggèrent que des mécanismes indépendants de la SURVIVINE ou de XIAP étaient responsables de la résistance à l'apoptose de l'autre moitié des fibroblastes étudiés. De plus, ces auteurs ont montré que l'expression de ces deux protéines inhibitrices de l'apoptose était régulée de manière positive par le TGF- β et l'ET-1 et de manière négative par la PGE2 dans les fibroblastes provenant de poumons témoins. Les mêmes expériences n'ont pas été reproduites dans les fibroblastes pulmonaires de FPI dans ces études.

Il a aussi été rapporté une augmentation de l'expression de FLICE-Like Inhibitory Protein (c-FLIP) in vitro et in vivo dans les myofibroblastes provenant de poumons de patients atteints de FPI et dans les fibroblastes pulmonaires de souris traitées avec la bléomycine (Golan-Gerstl et al., 2012). Utilisant le modèle de souris, les auteurs ont montré que les myofibroblastes pulmonaires de fibrose détournent la signalisation Fas de l'apoptose vers la prolifération et que cette signalisation implique TRAF (TNF receptor-associated factor) et NF-kB. En effet, l'inhibition de c-FLIP renverse l'effet de l'activation de Fas, entraînant une augmentation de l'apoptose, une diminution de la prolifération et une diminution du recrutement de TRAF vers le complexe DISC (Cha et al., 2010).

c) Dérégulation des voies du développement

Comme nous l'avons mentionné précédemment, des études récentes indiquent que certaines dérégulations des voies du développement pourraient expliquer le

comportement anormal des cellules épithéliales et des fibroblastes dans la fibrose pulmonaire idiopathique. De plus, certaines de ces voies semblent directement impliquées dans le phénotype de résistance à l'apoptose des fibroblastes de FPI.

(i) WNT5A

Une étude de *Vuga Lj et al.* suggère l'implication de WNT5A dans la prolifération et la résistance des fibroblastes à l'apoptose indépendamment de la voie *Wnt/β-caténine*. En effet, les auteurs ont montré par comparaison d'expression de gènes que l'expression de WNT5A est augmentée dans les fibroblastes provenant de poumon de FPI par rapport aux fibroblastes pulmonaires témoins. De plus, l'ajout de WNT5A dans les fibroblastes pulmonaires témoins augmente la prolifération des fibroblastes, le niveau d'expression de fibronectine et d'α5-intégrine ainsi que la résistance des fibroblastes à l'apoptose induite par H₂O₂, mais diminue le niveau d'expression de β-caténine, tandis que l'inhibition de WNT5A entraîne une augmentation de l'activation de la caspase-3 (*Vuga et al.*, 2009). Cette étude suggère que la dérégulation de la voie Wnt via une dérégulation de Wnt5A participe à la résistance des fibroblastes à l'apoptose participant ainsi à la progression de la FPI.

(ii) Voie sonic hedgehog (SHH)

L'étude de *Bolaños et al.* montre aussi une implication de la voie SHH dans la résistance des fibroblastes à l'apoptose. En effet, SHH peut contribuer à l'expansion (comme un mitogène et un chimioattractant) et à la survie des fibroblastes, ainsi qu'à la production de matrice extracellulaire. En effet, SHH protège les fibroblastes pulmonaires de l'apoptose induite par TNF-α/INF-γ/Fas et cette protection est accompagnée d'un changement du niveau d'expression de protéines régulatrices de l'apoptose. En absence de stimulus apoptotique, SHH inhibe l'expression des facteurs pro-apoptotiques Smac/DIABLO et TNFR1 et induit l'expression du facteur anti-apoptotique cIAP-2 dans les fibroblastes pulmonaires. Dans les fibroblastes traités avec TNF-α/INF-γ/Fas, SHH inhibe également l'expression de molécules activatrices de l'apoptose comme la forme phosphorylé de P53, la caspase-3 activée et augmente l'expression des inhibiteurs de l'apoptose, comme HTRA2/OMI, XIAP et cIAP-1/2

(Bolanos et al., 2012). Ces résultats récents suggèrent un rôle supplémentaire de la voie *hedgehog* dans la pathogenèse de la FPI favorisant la résistance des fibroblastes de FPI.

(iii) Bone morphogenetic proteins (BMP)

Les BMPs appartiennent à la superfamille du TGF- β et ont un rôle essentiel dans le développement embryonnaire et postnatal. Gremlin (Grm), le principal antagoniste de BMP régule la croissance des membres au cours de l'embryogenèse chez la souris (Walsh et al., 2010) et également la formation des ramifications pulmonaires. *Koli et al.* ont observé une augmentation de l'expression de *Gremlin* dans les fibroblastes pulmonaires provenant de patients FPI associé à une altération de la réponse à BMP-4 endogène et exogène (Koli et al., 2006). Les auteurs suggèrent que l'augmentation de l'expression de gremlin pourrait atténuer la phosphorylation induite par la signalisation de BMP dans le poumon conduisant à une diminution de l'apoptose des myofibroblastes.

Ainsi, la perturbation de certaines voies du développement semble être impliquée dans le comportement anormal des fibroblastes dans la FPI dont la résistance à l'apoptose des fibroblastes.

VIII. CONCLUSION

La fibrose pulmonaire idiopathique est une maladie interstitielle pulmonaire progressive dont la pathogenèse n'est pas encore bien comprise. Cependant, les travaux récents cités dans les paragraphes précédents, suggèrent que l'apoptose des cellules épithéliales pourrait être un événement précoce et robuste dans la progression de la maladie.

Des dérèglements identiques ont été observés dans d'autres pathologies comme la BPCO et le cancer du poumon (Chilosi et al., 2012), (Polakis, 2012). La FPI et la BPCO montrent des schémas pathologiques commun comme des réponses apoptotiques perturbées, une sénescence accélérée du parenchyme pulmonaire ou encore une dérégulation des voies du développement (Chilosi et al., 2012). Un dérèglement de la

balance apoptotique et la sénescence accélérée du parenchyme pulmonaire peuvent être déterminés par un dysfonctionnement des télomères, divers facteurs génétiques de prédisposition, et des dommages oxydatifs induits par le tabagisme dans la FPI et la BPCO. La plupart des voies qui jouent un rôle essentiel au cours du développement embryonnaire sont inactivées plus tard dans la vie, aussi certaines d'entre elles peuvent être réactivées de manière transitoire au cours de la réparation chez l'adulte. Une activation aberrante de ces voies au cours de l'homéostasie chez l'adulte peut mener à la progression de pathologies pulmonaires menant à la FPI, la BPCO ou encore le cancer (Akiri et al., 2009). La dérégulation des voies du développement principalement *Wnt* peuvent mener à un remodelage tissulaire anormal et une déficience fonctionnelle qui caractérisent le parenchyme alvéolaire de la FPI et de la BPCO. De plus, les études récentes de l'expression des microARNs mettent en évidence leur rôle dans la FPI, la BPCO et le cancer (Pandit et al., 2011), (Li et al., 2011a), (Huang et al., 2013).

A ce jour, l'implication des fonctions pro-apoptotiques des protéines de la famille BCL-2 a été mise en évidence dans la pathogenèse de la fibrose pulmonaire idiopathique, principalement pour leur rôle dans l'apoptose des cellules épithéliales. Cependant, les fonctions non-apoptotiques des protéines de la famille BCL-2 intensivement étudiées ces dernières années, n'ont jamais été impliquées ou étudiées dans la FPI, en particulier la forme nucléaire de la protéine BAX.

Résultats

Identification des fonctions non-apoptotiques de la forme nucléaire de BAX in vitro.

Manuscrit en phase finale de préparation

Contexte et justification de la recherche

L'apoptose joue un rôle clé dans le développement de nombreux organes et dans l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. Les protéines de la famille BCL-2 sont des éléments essentiels de la machinerie apoptotique. Ces protéines agissent comme des

régulateurs anti- ou pro-apoptotiques. Parmi les membres de la famille BCL-2, le facteur pro-apoptotique BAX contrôle la voie mitochondriale de l'apoptose. Des perturbations de l'apoptose ont été mises en cause dans des maladies pulmonaires telles que la fibrose pulmonaire idiopathique.

La fibrose pulmonaire est caractérisée par l'accumulation de composants de la matrice extracellulaire et de fibroblastes dans les espaces aériens distaux. Le pronostic de la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est particulièrement mauvais puisque la médiane de survie est de 3 à 5 ans. Il n'existe actuellement aucune thérapeutique efficace dans la fibrose pulmonaire. Il est donc nécessaire d'identifier de nouvelles voies physiopathologiques et cibles thérapeutiques dans cette maladie.

Des études récentes suggèrent fortement que les protéines de la famille BCL-2 sont également impliquées dans d'autres fonctions cellulaires que le contrôle de l'apoptose. De plus, la protéine BAX est aussi localisée dans le noyau de nombreux types cellulaires. Même si le rôle de la fraction cytoplasmique de BAX au cours de l'apoptose est assez bien caractérisé, les fonctions nucléaires de BAX ne sont pas connues. Dans cet article, nous avons voulu étudier les fonctions non-apoptotiques de la forme nucléaire de la protéine proapoptotique BAX dans différents types cellulaires d'origine pulmonaire.

Résumé des principaux résultats

La protéine BAX est présente dans le noyau à proximité de l'euchromatine.

Dans un premier temps, nous avons identifié différents modèles cellulaires où BAX présentait une localisation nucléaire. Ensuite, nous avons montré dans les cellules épithéliales alvéolaires transformées A549, bronchiques immortalisées Beas2B et des fibroblastes primaires pulmonaires témoins que la protéine BAX se trouvait à proximité de la chromatine. Entre autres, nous avons identifié HP1 γ , une protéine nucléaire associée à la fois aux domaines de l'euchromatine et de l'hétérochromatine, comme l'un des partenaires nucléaires de BAX.

La forme nucléaire de BAX est impliquée dans la progression du cycle cellulaire et dans le contrôle de l'état de différenciation myofibroblastique en condition basale.

Pour mettre en lumière le rôle potentiel de la forme nucléaire de BAX dans des cellules non-apoptotiques, nous avons d'abord montré que la diminution globale par ARNi de *BAX* était suffisante pour diminuer la prolifération dans les cellules A549 et les fibroblastes primaires en induisant l'expression de plusieurs inhibiteurs des cyclines kinases. La baisse du niveau d'expression de BAX induisait aussi une augmentation d'expression de marqueurs de différenciation myofibroblastique dans les fibroblastes pulmonaires. D'autre part, la surexpression d'une forme de BAX préférentiellement ciblée vers le noyau permettait d'observer l'effet inverse aux ANRi dirigé contre *BAX* suggérant fortement que la forme nucléaire de BAX était impliquée dans ces fonctions cellulaires non-apoptotiques.

La forme nucléaire de BAX est détectée dans le poumon fœtal et pathologique chez l'adulte.

Enfin, nous avons montré que la localisation nucléaire de BAX n'était pas seulement observée in vitro. En effet, la localisation de BAX était nucléaire sur des coupes de tissus de poumon fœtal (phase pseudoglandulaire) et de poumons pathologiques adultes (carcinomes et fibrose). Par contre, peu de cellules présentant un marquage nucléaire pour BAX sont détectées dans l'espace alvéolaire normal chez l'adulte. Ainsi, la forme nucléaire de BAX pourrait être impliquée dans la progression de différentes maladies pulmonaires comme les carcinomes et la fibrose.

Il faut noter que les résultats obtenus avec les fibroblastes de patients de fibrose ne sont pas présentés dans ce manuscrit. Par rapport aux fibroblastes contrôles, les travaux effectués avec les fibroblastes de fibroses ne sont pas aussi aboutis. Cependant, ces résultats seront présentés et discutés dans la partie discussion de la présente thèse et ils feront bien sûr l'objet d'un futur article.

Titre : Deciphering the basic cellular functions controlled by the nuclear form of the pro-apoptotic protein BAX in non-apoptotic cells.

(voir le manuscrit page suivante).

NdlA : Je tiens à souligner que ce manuscrit est une version très avancée de l'article final. Cet article sera soumis au jugement de la communauté scientifique internationale au moment de l'oral de thèse en décembre 2013.

**Deciphering the basic cellular functions controlled by the nuclear form of the
pro-apoptotic protein BAX in non-apoptotic cells.**

Stéphanie Brayer^{1,2,3}, Audrey Johannes^{1,2,3}, Elisa Gregianin^{1,2,3}, Joëlle Marchal Sommé^{1,2,3}, Aurélie Fabre⁴, Yves Castier^{1,2,3,5,6}, Bruno Crestani^{1,2,3,5,7} and Arnaud A. Mailleux^{1,2,3}

¹ INSERM U700, 16 rue Henri Huchard 75018, Paris, France.

² DHU FIRE, Paris, France.

³ Labex Inflammex, Paris, France.

⁴ St Vincent's University Hospital, Dublin 4, Ireland

⁵ Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 75018, Paris, France.

⁶ Assistance-Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Service de Chirurgie Thoracique et Transplantation Pulmonaire, Paris, France ;

⁷ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat, Service de Pneumologie, 75018, Paris, France.

Corresponding author: Dr. Arnaud Mailleux, INSERM, U700, 16 rue Henri Huchard 75018, Paris, France. E-mail: arnaud.mailleux@inserm.fr; Phone: (33)157277584 ; Fax: (33)157277551

Running title: BAX in the nucleus.

Abstract

The involvement of the BCL-2 family proteins in apoptosis has undergone intensive investigation during the past two decades. Nevertheless, It becomes more and more evident that the BCL-2 family proteins also mediate a wide range of basic cellular functions in non-apoptotic cells. BAX, a key pro-apoptotic member of the BCL-2 protein family, was also present in interphasic nuclei of non-apoptotic Human cancer cell lines. Whether the nuclear form of BAX could be involved in non-apoptotic function is still unknown. Hence, we first screened in vitro for possible BAX nuclear localization in epithelial lung cell lines and primary human lung fibroblasts. Next, we showed in transformed alveolar epithelial A549 cells, immortalized normal bronchial epithelial Beas2B cells and primary lung fibroblasts that BAX was in close proximity to chromatin in the nucleus, preferentially to histone marks enriched in active promoter regions. We also identified HP1 γ , a non-histone nuclear protein associated with both euchromatin and heterochromatin domains, as one of BAX nuclear partners. In order to decipher the potential role of nuclear BAX in non-apoptotic cells, we first showed that decreasing total BAX protein level with siRNA was sufficient to impact cell proliferation in A549 cells and primary HLF by upregulating the expression of several cyclin-dependent kinase inhibitors. *BAX* knock down also increased basal myofibroblastic differentiation in primary lung fibroblasts in correlation with an up-regulation of TGF- β 1 mRNA expression. On the other hand, a BAX construct preferentially targeted to the nucleus elicited the opposite phenotype than *BAX* siRNA suggesting strongly that nuclear BAX was involved in non-apoptotic basic cellular functions in vitro. Finally to strengthen our findings, we showed that BAX nuclear localization was not only observed in vitro. Indeed, BAX was nuclear in tissue sections from Human fetal lung undergoing branching morphogenesis and from adult Human pathological lungs (carcinomas and fibrosis), while few BAX positive nuclear cells were observed in the normal adult alveolar space. In conclusion, our study established, for the first time at our knowledge, a strong link between the nuclear localization of the pro-apoptotic BAX protein and several key basic cellular functions in a non-apoptotic setting.

Introduction

The BCL-2 family proteins are essential components of the core apoptotic machinery as they act as anti- or pro-apoptotic regulators. Two members of this protein family, BAX and BAK form a requisite gateway for the mitochondrial apoptotic pathway [1]. BAX (namely, BCL-2-Associated X protein) was the first identified pro-apoptotic member of the BCL-2 protein family [2]. The majority of BAX proteins are found in the cytoplasm in a closed / globular conformation in healthy cells. But upon initiation of apoptotic signaling, BAX undergoes a conformational change that exposes its NH₂- and COOH-terminal segments [1]. In this “active” conformation, BAX will insert into the outer mitochondrial membrane triggering the mitochondrial outer membrane permeabilization and leading to the activation of the caspase cascade [1].

Thus, BAX is one of the gatekeepers that control mitochondrial Cytochrome c release into the cytoplasm during apoptosis. However, growing evidences suggest that BCL-2 family proteins are also involved in a wide variety of non-apoptotic cellular activities [3]. For instance, the pro-apoptotic BAX and BAK proteins in cooperation with the anti-apoptotic BCL-2 and BCL-X_L proteins regulated cell cycle progression in mouse embryonic fibroblasts (MEF) in vitro [4]. BAX was also necessary to maintain energy production by supporting the mitochondrial network in non-apoptotic HCT-116 colon cancer cells and primary mouse hepatocytes [5]. More surprisingly, BAX protein was also present in interphasic nuclei of healthy mammalian cells such as mammary epithelial transformed MCF-7 cells [6] and in seven out ten human lung epithelial cancer cell lines assayed in [7]. But neither the functions nor partners of BAX in the nucleus were investigated at our knowledge.

On one hand, imbalance in the apoptotic machinery participates to the disruption of tissue homeostasis in lung diseases as an example. Defects in apoptosis have been implicated in the progression and chemotherapy resistance of epithelial lung tumors [8]. Meanwhile, such apoptotic dysregulation takes place also in non-cancerous lung diseases such as idiopathic pulmonary fibrosis.

In this deadly interstitial lung disease, accumulation of extra-cellular matrix proteins and fibroblasts in the distal airways as well as epithelial remodeling lead to the disorganization and destruction of the alveoli [9]. Indeed, lung fibroblasts derived from IPF patients are more resistant to extrinsic apoptotic stimuli than their control counterparts [9]. On the other hand, such imbalance in apoptotic machinery components also probably impairs their non-apoptotic functions. This second “non apoptotic” hit could consequently participate to disease progression at the same extent than perturbation of their apoptotic tasks in non-dying cells during the development of diseases such as lung cancer or fibrosis [10, 11].

Here, we hypothesized that nuclear BAX could play a role in basic cellular functions in non-apoptotic cells. First, we confirmed that BAX nuclear localization was quite common in a variety of non-apoptotic cell lines in vitro. Hence, we depicted precisely the localization of BAX within the different nuclear compartments (opened or closed chromatin, nuclear lamina). We also identified potential nuclear partners for BAX in lung epithelial cells and primary lung fibroblasts. Next we deciphered the involvement of cytosolic or nuclear BAX in basic cellular functions such cell proliferation and myofibroblastic differentiation. Finally to support our in vitro findings, we investigated whether BAX nuclear localization could be observed in Human pathologies such as lung cancer and fibrosis compared to normal Human fetal and adult lung tissues.

Results

BAX is an opened confirmation within the interphasic cell nucleus.

Even though the role of BAX cytoplasmic fraction during apoptosis has been actively characterized [1], the nuclear function of BAX is still unknown. First, we identified appropriate cellular models for studying BAX nuclear functions in non-apoptotic cells in vitro. Knowing that BAX nuclear localization was previously reported in epithelial cell lines derived from lung cancer [7], we confirmed by immunofluorescence that BAX was localized in the nucleus and the cytoplasm of the transformed alveolar epithelial A549 cells and immortalized bronchial epithelial Beas2B cells in vitro (Figure 1A-B) using an antibody raised against an epitope in the vicinity of BAX BH3 domain. BAX nuclear localization was not restricted to the epithelial lineage as a similar expression pattern was observed in primary Human lung fibroblasts (HLF) (Figure 1C). BAX nuclear localization was also confirmed by confocal microscopy approach (data not shown). In control experiments, additional cell lines such as immortalized Human mammary epithelial MCF-10A cells, transformed Human mammary epithelial SUM-159 and MDA-MB-231 cells, transformed Human cervical epithelial Hela cells, mouse lung alveolar epithelial MLE-15 and primary adult mouse lung fibroblasts displayed a BAX nuclear staining by immunofluorescence (Figure S1). In all these experiments, the cells were cultured in optimal conditions using full growth medium.

In another set of experiments, we utilized the Anti-Bax 6A7 antibody which is conformation dependent and that recognizes a N-terminal epitope exposed after BAX activation during apoptosis [12] (figure 1D-F). It was reported that Triton X-100, but not CHAPS detergent could also induce the conformational change of BAX from globular to opened that exposed this epitope [13]. We observed a similar BAX nuclear staining after Triton X-100 or CHAPS treatment during the immunofluorescence protocol [12] suggesting that N-terminal BAX epitope was constitutively exposed in the nucleus (Figure 1D-F). In order to definitely rule out non-specific staining, the nuclear BAX staining pattern was also confirmed with a third antibody, raised against the BH2

domain of BAX (Figure S2). BAX nuclear localization was further confirmed by subcellular fractionation in these three cell types (Figure S2). To determine whether BAX was the only member of the BCL-2 protein family present in the nucleus, the cellular localization of BAX main cytosolic and mitochondrial partners such as BCL-2, BCL-XL and BAK was investigated by immunofluorescence. BAK and BCL-XL proteins were detected at the mitochondria as previously reported {Kilbride, 2013 #261} but absent from the nucleus in A549, Beas2B cell lines and primary HLF (Figure S3). Meanwhile, BCL-2 was detected in the nucleoli as previously reported {Hoetelmans, 2000 #79; Salah-eldin, 2000 #188}). We confirmed that BCL-2 co-localized with Fibrillarin, a nucleolus marker {Bartova, 2010 #264} in these cells (figure S3). BCL-2 localization in nucleoli was confirmed with a second antibody against BCL-2 (data not shown). Meanwhile, immuno-fluorescence for BAX and Fibrillarin strongly suggested that BAX nuclear staining was not associated with the nucleoli in A549, Beas2B cells and primary HLF (Figure S4).

Overall, our results showed that BAX was nuclear in healthy Human and mouse cell lines and probably in an opened conformation within the nuclei of these non-apoptotic cells in vitro.

BAX is in close proximity with the chromatin in A549, Beas2B cells and primary HLF.

To further characterize BAX nuclear form, it was crucial to determine whether BAX either diffused freely in the nuclear sap or interacted with certain nuclear compartments such as chromatin, the nucleomatrix or the nucleoli. First, a histone association assay [14] performed in A549 cells revealed that BAX co-immunoprecipitated with Histone H2B (Figure 1G), a key protein component of chromatin. This result suggested strongly that BAX might interact with chromatin.

To confirm these initial findings in A549 cells and additional cell types, BAX precise subcellular localization was next investigated by a differential extraction approach in A549, Beas2B cells and primary HLF treated with the cell-permeable cross-linker DSP to preserve protein-protein interactions [15]. In this protocol, cross-linked cells were treated with 0.1%TX-100mCSK, which extracts not only cytoplasmic but also nuclear proteins not tightly bound to nuclear structures. Protein complexes were further extracted with high salt buffer (0,5M NaCl) and the cells were

finally digested with Micrococcal nuclease to remove the bulk of chromatin [15]. BAX subcellular localization was then assayed by immunofluorescence, while the nucleus was revealed with an antibody against Lamin A/C, a component of the nuclear lamina [16]. BAX nuclear staining (figure 2) was maintained after the extraction with Triton X-100 and high salt buffer indicating that BAX was covalently cross-linked to salt-insoluble nuclear proteins (Figure 2A,B). To investigate whether BAX was linked to chromatin or non-chromatin nuclear structures, the Triton- and salt-extracted nuclei were digested with Micrococcal nuclease (MNase). This treatment stripped most nuclear BAX staining (Figure 2C) confirming that BAX was cross-linked with chromatin-associated proteins in these cells. However the remaining nuclear BAX co-localized with Lamin A/C as shown by immunofluorescence (Figure 2C) suggesting that a fraction of nuclear BAX interacted with the nuclear lamina in A549, Beas2B cells and primary HLF as well.

Next we utilized a proximity ligation assay (PLA) to confirm these results and to gain more insights into nuclear BAX localization in situ. This approach depicts the close proximity between two targets epitopes at a distance between 30-40 nm in order to generate a fluorescent signal [17]. We screened by PLA the potential close proximity between BAX and different epigenetic histone marks or non-histone nuclear proteins in A549, Beas2B cells and primary HLF as well.

With the approach, we showed that nuclear BAX (Figure 3A) was in close proximity with epigenetic marks associated with euchromatin such as the acetylated forms of Histone H2B, H3 and H4 (Figure 3B and data not shown) in A549, Beas2B and primary HLF [18]. BAX was also close to Histone H3 trimethylated on Lysine 4 (H3K4me3) that is associated with actively transcribed promoters (Figure 3C) but not with H3K36me3 that is enriched in actively transcribed gene bodies [18] (data not shown). BAX was also close to the non-histone protein HP1 γ in A549, Beas2B and primary HLF (Figure 3D). HP1 γ is associated with both euchromatin and heterochromatin domains [19]. The interaction between BAX and HP1 γ was confirmed by immunoprecipitation in A549 cells (Figure S6). BAX protein was also near the repressive H3K9me3 histone mark that binds HP1 γ [20] as revealed by PLA (data not shown). But BAX was not in close proximity with other prominent

histone marks of transcriptional repression such as H3K27me3 and H3K9me2 [18] (data not shown). PLA did not reveal any proximity between BAX and the general transcription factor TATA-binding protein (TBP) [20], the transcription factor P53 [20] or the DNA binding protein KU70 [21] (data not shown). However, we confirmed that BAX was associated with Lamin A/C in the nuclear lamina [22] of A549, Beas2B and primary HLF by this approach (Figure 3E).

In conclusion, we showed with different approaches that BAX was not simply diffused in the nuclear sap. Our results strongly suggested that a fraction of nuclear BAX interacted with different nuclear compartments such as active regions of chromatin or the nuclear lamina in A549, Beas2B and primary HLF as well.

Nuclear BAX is involved in the cell cycle progression of lung epithelial A549 cells and primary lung fibroblasts in vitro.

In the light of this close proximity between BAX and the chromatin, we next investigated whether nuclear BAX could be implicated in basic cellular functions in non-dying cells. Alveolar homeostasis involves epithelium - fibroblast interactions. Consequently, it is critical to study both epithelial cells and fibroblasts as dysregulation of their interactions have been implicated in lung cancer and fibrosis pathogenesis.

In a first step, we assayed the effects of *BAX* knock down on basic cellular functions such as proliferation in epithelial (A549 cells) and mesenchymal (primary HLF) cell lineages. We also investigated the effect of BAX partial loss of function on basal myofibroblastic differentiation in primary HLF. But this approach will not distinguish between cytoplasmic and nuclear functions. For this reason, we next investigated whether overexpression of BAX constructs either preferentially targeted or excluded from nucleus would elicit the opposite phenotypic effects than *BAX* siRNA in A549 cells and primary HLF.

BAX protein expression level was drastically reduced in A549 lung epithelial cells and primary HLF using two independent BAX siRNA compared to cells transfected with control siRNA

(Figure 4A-B). Strikingly, cell count revealed that cell proliferation was significantly decreased in A549 cells (respectively 40.9% \pm 4.3 and 19% \pm 1.9 growth decrease for BAX siRNA #1 and #2, n=7) and primary HLF (respectively 26% \pm 5 and 24,6% \pm 2.4 growth decrease for BAX siRNA #1 and #2, n=7) at 48h treated with the two BAX siRNA sequences compared to mock siRNA (Figure 4C). No cytotoxic effect was observed in these experiments (data not shown). Additionally, a decrease in colony formation was observed in a clonogenic assay with BAX siRNA treated A549 cells (respectively 44% \pm 5 and 32% \pm 3.2 decrease for BAX siRNA #1 and #2, n=3) compared to control siRNA (Figure 4D). In this assay, we A549 cells were serum deprived for 5 days to challenge cell survival then cultures in full growth medium to form colonies for a week. Altogether, these results suggested that BAX was involved in proliferation in A549 cells and primary HLF (Figure 4A-C). BAX could also modulate survival and growth in A549 cells as revealed by the clonogenic assay (Figure 4D).

Measurement of cellular DNA content with PI by FACS was performed to better characterize the decrease in cell proliferation in cells treated with BAX siRNA. Cell cycle analysis revealed a significant decrease in S phase in epithelial A549 cells (respectively 36% \pm 4.6 and 29,8% \pm 1.3 decrease for each BAX siRNA sequence, n=3) and primary HLF (respectively 32% \pm 7.8 and 29,5% \pm 4.6 decrease for BAX siRNA #1 and #2, n=3) treated with siRNA compared to non-targeting siRNA (Figure 4E-F). An increase in G1 phase was observed concomitantly with this decrease in S suggesting that siRNA *BAX* treated A549 cells and HLF were undergoing a G1/S phase arrest (Figure E-F).

Hence, the effects of *BAX* knock down on the expression of negative regulators of the cell cycle at the G1/S phase were assayed in A549 cells and primary HLF. The expression of P21 was increased in both A549 cells and primary HLF transfected with siRNA compared to mock (t=48h) at the mRNA and protein levels (see Figure 5). The suppressor of tumor P53 is one the major regulator of P21 expression in different cell types [23]. Surprisingly, we observed only an increase of P53 protein expression in lung epithelial A549 cells transfected with BAX siRNA compared to

control cells (t=48h) (Figure 5A-B). *P53* mRNA expression was not different in control and BAX siRNA treated primary HLF (t=48h, n=6) (Figure 5C). Meanwhile, total P27 expression at the mRNA and protein level was unaffected by *BAX* siRNA at 48h in both cell type (Figure 5). However, immunoblot approach revealed that BAX knock down increased the expression of P27 phosphorylation on Ser-10 (a major site of phosphorylation in resting cells [24]) in both A549 cells and primary HLF compared to mock siRNA-transfected cells (figure 5B and D). We also observed an upregulation of P16 expression only at the mRNA level in HLF transfected with *BAX* siRNA (Figure 5C and data not shown) compared to mock condition. The *P16/ARF* locus is deleted in the A549 cell line [25]

Our results suggested that several cyclin-dependent kinase inhibitors were upregulated in BAX siRNA treated A549 and HLF in a cell-type dependent manner concomitantly with a decrease in cell growth. But this siRNA approach could not distinguish between cytoplasmic and nuclear BAX functions. Therefore, we utilized BAX constructs preferentially targeted either to the nucleus or the cytoplasm in lung cells. On one hand, a sequence containing two “nuclear localization signal” (NLS) [26] was added to the N-terminus of a FLAG HA tagged BAX construct to target it to preferentially to the nucleus. On the other hand, to exclude BAX proteins from the nucleus, a sequence containing two “nuclear export signal” (NES) [26] was added to the N-terminus of a FLAG HA tagged BAX constructs.

First, we validated these tools in A549 cells transiently transfected with NLS-BAX-FLAG or NES-BAX-FLAG constructs. The transfected A549 cells were then subjected to cytoplasm / nucleus fractionation after 48h (n=3). Western blot analysis with BAX antibody revealed that NLS-BAX proteins were present in both cytoplasm and nuclear fraction, while NES-BAX proteins were excluded from the nucleus and detected only in the cytoplasmic fraction (Figure 6A). Similar results were obtained in HLF transiently transfected with either NLS-BAX or NES-BAX plasmids (data not shown).

Our data showed that A549 overexpressing NLS-BAX (n=3) displayed an increase in

proliferation at 48h about 1.45 fold \pm 0.1 (n=3) compared to control plasmid (pCDNA 3.1 empty vector). In contrast, NES-BAX transient overexpression in A549 cells did not change cell number compared to control plasmid (1.09 fold \pm 0.08 compared to control plasmid) (Figure 6B). No cytotoxic effect was detected in A549 transfected with NES BAX or NLS BAX constructs compared to control plasmid (data not shown). Similarly, an increase of 2.5 fold \pm 1.1 (n=3) in cell number at 48h was observed in HLF transfected only with NLS-BAX constructs at 48h (Figure 6B). Unlike A549, a slight cytotoxic effect was detected in primary HLF transfected with NES-BAX construct ((0.87 fold \pm 0.2 compared to control plasmid, n=3) and data not shown).

With respect to cell cycle regulators previously investigated (see Figure 5), only the overexpression of NLS-BAX construct decreased P21 protein expression level in both A549 cells and primary HLF assayed by western blot (Figure 6C-D). P53 protein level was not affected by NLS-BAX or NES-BAX constructs in A549 cells and primary HLF at 48h as shown by western blot (data not shown). The expression level of Phospho-P27 / total P27 proteins were unchanged in A549 cells transfected with NLS-BAX or NES-BAX constructs at 48h (n=3) compared to control vector (n=3, Figure 6C). Meanwhile, a slight decrease in P-P27(S10) was observed only in primary HLF transfected with NLS-BAX construct compared to control vector or NES-BAX treated cells (total P27 level was unaffected, figure 6D). In contrast, the expression level of P16 protein was unaffected in primary HLF overexpressing NLS-BAX or NES-BAX as assayed by western blot (data not shown).

Altogether, our results showed that only the overexpression of a BAX constructs preferentially targeted to the nucleus (NLS-BAX) elicited the opposite effects than *BAX* siRNA on cell proliferation in lung epithelial A549 cells and primary HLF in association with a decrease in P21 expression.

Nuclear BAX modulates partially basal myofibroblastic differentiation state of primary lung fibroblasts in vitro.

Given the appropriate microenvironment, fibroblasts can differentiate and acquire some

characteristic of smooth muscle cells. These differentiated fibroblasts termed “myofibroblasts” occur in normal tissue and they are critically important in wound Healing [9, 27]. During myofibroblastic differentiation, fibroblasts undergo partial smooth muscle differentiation (expression of α SMA marker) and become active producers of cytokines and ECM proteins [9, 27].

We observed at basal level that knocking down *BAX* increased alpha- smooth muscle actin mRNA expression in primary HLF (n=4) compared to HLF transfected with mock siRNA by qPCR, whereas Collagen 1 mRNA expression levels was not affected (Figure 7A). This increase in myofibroblastic markers correlated with an increase in *TGF β 1* mRNA level in *BAX* siRNA treated HLF compared to mock condition (Figure 7A). The pro-fibrotic cytokine TGF- β 1 is a very potent inducer of myofibroblastic differentiation [9]. By immunoblot, we observed that decreasing *BAX* expression with siRNA did increase the basal expression myofibroblast markers such as α SMA and COL1 proteins in primary HLF compared to control cells (Figure 7B). In addition, these results suggested that BAX modulated α SMA expression at the transcriptional level, while its effect on COL1 expression was probably post-transcriptional (compare Figure 7A and B).

In a gain of function approach, only the overexpression of NLS-BAX construct decreased the expression levels of α SMA protein in primary HLF compared to cells transfected with the empty vector or NES-BAX constructs (Figure 7C). Meanwhile, COL1 protein level was decreased in HLF overexpressing either NLS-BAX and NES-BAX constructs (Figure 7C) compared to control plasmid. However, the NLS-BAX construct was more efficient in diminishing basal COL1 protein level compared to the cells overexpressing NES-BAX construct (Figure 7C).

Overall, our in vitro results suggested for the first time at our knowledge that nuclear forms of BAX could be implicated in basic cellular functions in non-dying cells.

BAX nuclear localization in normal and diseased Human lung tissues.

In vitro, we showed that BAX was present in interphasic nuclei of different lung cell types and that nuclear BAX was involved in basic non-apoptotic functions such as cell cycle progression

and myofibroblastic differentiation. However, whether BAX was present in the nucleus in normal and pathological Human lung tissues was not reported at our knowledge. To strengthen our in vitro findings, we assayed BAX subcellular localization by immunohistochemistry in paraffin sections from normal Human fetal and adult lungs compared to diseased lungs tissues such as epithelial tumors and fibrosis (Figure 8).

During the pseudoglandular stage (12 weeks), fetal lung tissue undergoing branching morphogenesis displayed nuclear BAX staining (Figure 6A-B) in the epithelium (57.3% \pm 4.1 BAX nuclear positive cells, n=3) and the mesenchyme (51.8% \pm 3.8 BAX nuclear positive cells, n=3) as well. BAX nuclear localization was also observed in additional embryonic tissues such as the bronchia, the esophagus, the heart, the striated muscle and the skin (supplemental Figure S5).

Meanwhile in the adult lung (Figure 8C), few BAX nuclear positive cells were observed in the normal lung alveolar parenchyma (2.2% \pm 0.71 BAX nuclear positive cells, n=5). Nuclear BAX staining was also observed in alveolar macrophages (data not shown). BAX localization was also broadly cytoplasmic in the normal liver and kidney parenchyma (Figure S5). However, the normal bronchiolar lung epithelium (25.85% \pm 3.9 BAX nuclear positive cells, n=5) displayed BAX nuclear positive cells (Figure 8C). Similarly, BAX nuclear positive cells were observed in other adult normal tissues such as the gastric epithelium and in the pancreas (Figure S5). Our results suggest that BAX nuclear localization seemed tissue-specific in a normal condition. Nevertheless, only few BAX positive cells were detected in the normal adult alveolar parenchyma.

Next, we assayed BAX nuclear localization on lung cancer Human paraffin tissue arrays. In contrast with normal alveolar space, BAX nuclear expression was strongly expressed in the epithelial tumors cells from lung adenocarcinomas (80.6% \pm 4.6 BAX positive tumor cells, n=20) and from small cell lung carcinomas (SLCL, 54.3% \pm 5.3 BAX positive tumor cells, n=8) as showed in Figure 8D and E. BAX nuclear positive cells were also observed within the stroma of these tumors (data not shown). We also assayed BAX nuclear localization in patients suffering from idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), a non-cancerous but lethal chronic interstitial lung disease [27].

BAX was detected in the nuclei of the hyperplastic epithelial cells in the aberrantly remodeled distal lung parenchyma (54.9% +/- 2.7 BAX nuclear positive cells, n=5) and in the fibroblasts organized in foci (44.3% +/- 3.3 BAX nuclear positive cells, n=5) (figure 8F-G). Nuclear BAX positive epithelial cells were also observed in IPF bronchiolised distal airspaces [28] (Figure 8H). BAX nuclear localization was also confirmed with another primary antibody against BAX in control and IPF lung tissues by immunohistochemistry (data not shown).

Our in vitro results also suggested strongly that HP1 γ was a partner of BAX in the nucleus. In paraffin tissue sections, HP1 γ expression was associated with BAX nuclear localization in the normal bronchiolar epithelium by IHC, while few HP1 γ positive cells were observed in the alveolar space where BAX was mainly cytoplasmic (figure S6). In contrast, a strong association between BAX and HP1 γ nuclear patterns was observed in the fetal lungs at 12 weeks, epithelial lung tumors and in fibrotic areas from IPF lungs (compare Figure 8 and Figure S6).

In conclusion, our results strongly suggested that the localization of BAX in the nucleus concomitantly with its potential partner HP1 γ was increased in remodeling tissues such as fetal lung undergoing branching morphogenesis and pathological conditions such as lung cancer and fibrosis compared to normal lung tissue sections.

Discussion

BAX and other members of the BCL-2 family are present in interphasic nucleus.

The proteins of the BCL-2 family have been extensively studied during the past decades for their cytoplasmic / mitochondrial role in cell death regulation [1]. Conversely, we aimed to a better understanding of BAX nuclear functions in non-dying cells in this study.

On one hand, it has been reported that BAX shuttled from the cytosol to the nucleus during apoptosis induced by hyperoxia in neonatal rat neurons [29], neuroexcitotoxic and epileptogenic compound in adult rat neurons [30], chemotherapeutic agents in Human melanoma [31] and glioma cells [32], growth factor deprivation in human colorectal carcinoma cells [33], irradiation in human dermal fibroblasts [34] or hyperthermia in human epithelial lung cancer cell lines [35] and rat testicular germ cells [36]. But the consequences of BAX shuttling in the nucleus during apoptosis are still not clear. BAX nuclear localization in an apoptotic setting could be the consequences of the disruption of the nucleocytoplasmic barrier by the activated caspases during apoptosis [37]. Furthermore, it has been shown BAX was involved in the subcellular redistribution of nuclear proteins from the nucleus to cytoplasm in response to stressor stimuli before the appearance of apoptotic features [38]. All these studies suggest that BAX could also have nuclear functions during the execution of apoptotic program, in addition of its critical mitochondrial tasks.

On the other hand, BAX nuclear localization was previously reported in non-apoptotic epithelial cancer cell lines derived from human lung [7, 39] and breast [6]. Here, we showed that BAX nuclear localization is a salient feature observed in both non-dying / proliferating epithelial and mesenchymal cell types of either human or mouse origin. However, the mechanisms regulating BAX nuclear localization in healthy cells will require further study. Indeed, BAX lacks bona fide nuclear localization signal (NLS) and nuclear export signal (NES) like the other members of the BCL-2 family[7] at the exception of the pro-apoptotic BOK protein and a short variant of the anti-apoptotic A1/BFL1. Indeed, Human BOK protein bears a leucine-rich sequence indicative of a nuclear export signal within its BH3 domain [40], while short A1/BFL1 variant displays a typical

NLS motif in its carboxy terminal part [41]. One possibility would be that BAX protein (21kDa) diffuses probably passively from the cytosol to the nuclear sap as small proteins can cross freely the nuclear envelope through the nuclear pore complexes. Next, BAX would be retained in the nucleus by its interaction with its nuclear partners.

We showed that BAX was in an opened / active conformation within the nucleus and interacted with the nuclear matrix and the chromatin as well. Thus, BAX was in close proximity with Lamin A/C, a key component of the nucleoskeleton. The interaction of BAX with the nuclear matrix was previously reported in cultured cancer Human cell lines using an embedment-free immunogold electron microscopy [42]. Interestingly, Lamin proteins are involved in the regulation of numerous nuclear processes, including gene transcription [16]. Furthermore, our results suggested for the first time at our knowledge that BAX was in close proximity with euchromatin domains. Indeed, BAX was in close proximity with histone marks enriched in actively transcribed promoters such as acetylated forms of Histone proteins and me3K4-Histone H3 [18]. Strikingly, BAX was not associated with H3K36me3 that is enriched in actively transcribed gene bodies [18] as well as with histone marks enriched in constitutive silenced heterochromatin such as H3K27me3 and H3K9me2 [18]. Finally, we showed that BAX interacted with a non-histone protein HP1 γ and its associated histone mark (H3K9me). To support this finding, we also observed that HP1 γ expression was associated with BAX nuclear localization in tissue sections from fetal lung, lung adenocarcinoma, small cell lung carcinoma and lung fibrosis as well. HP1 γ protein that is primarily associated with heterochromatin domains and gene silencing. However, HP1 γ was also recently involved in the regulation of gene promoter activation in euchromatin regions [18]. Altogether, these results suggested for the first time at our knowledge that BAX might interact with euchromatin specifically in the promoter regions of actively transcribed genes. Hence, it is tempting to speculate that BAX might directly regulate gene transcription but the study of BAX protein complex in the nucleus will require further investigation.

Another consequence of BAX nuclear retention would be to keep BAX away from the cytoplasm where it could elicit its deadly apoptotic functions by translocating from the cytosol to the mitochondrion outer membrane. Such mechanism has been recently described for the BH3-only protein BIM. During viral infection of immortalized endothelial cells by herpes virus 8 (HHV-8), the viral protein vIRF1 (viral interferon regulatory factors1) interacted with BIM and then sequestered BIM in the host nucleus to counteract the pro-apoptotic signals induced by the infection [43]. Others pro- and anti-apoptotic members of the BCL-2 protein family such as BOK, BCL-2 and MCL1- are also present in the interphasic nucleus of non-dying cells. It has been shown that BOK interacted with the nuclear Exportin protein CRM1. BOK was detected in both the nucleus and the cytoplasm of HEK 293T cells, HeLa cells and breast cancer cells [40]. In addition, nuclear BCL-2, but not BAX, interacted with nuclear PML (Promyelocytic leukemia protein) in MCF-7 cells. BCL-2 also interacted and stabilized the transcription factor HIF-1 α in the nuclei of hypoxic melanoma cells [44]. In addition, BCL-2 can interfere with DNA repair systems leading to genome instability in cells overexpressing BCL-2 [45]. Another anti-apoptotic BCL-2 protein, MCL-1 was tracked down in the nucleus where it interacted with PCNA (Proliferating cell nuclear antigen), a cofactor of DNA polymerase delta in Hela cells [46]. A shortened MCL-1 variant was also detected in the nucleus of murine myeloid cells interacting with the cell-cycle-regulatory protein kinase Cdk1 [47]. Hence, several pro- and anti-apoptotic members of the BCL-2 family (BAX, BOK, BIM, BCL-2 and MCL-1) can be present in the nucleus of non-dying cells. Whether the complex interactions that regulate their apoptotic functions in the cytoplasm [1] could take place in the nucleus to orchestrate non-apoptotic basic cellular functions is still unknown.

Non-apoptotic functions of BAX in cooperation with other members of the BCL-2 family.

It becomes more and more evident that the BCL-2 family protein also mediate a wide range of basic cellular functions in non-apoptotic settings such as cell cycle regulation, mitochondrial dynamic and bioenergetic [3, 5] as well as cell migration [48].

In the present study, we showed that decreasing total BAX protein level with siRNA was

sufficient to impact cell proliferation in A549 cells and primary HLF by regulating the expression of several cyclin-dependent kinase inhibitors in epithelial A549 cells and primary HLF. In addition, BAX knock down decreased colony formation by A549 cells in a clonogenic assay. This result might appear quite surprising, as one would expect a better survival of the cells in the absence of the pro-apoptotic protein BAX. However, it has been previously shown that BAX loss of function can be compensated by BAK, the other gatekeeper of the intrinsic apoptotic pathway [1]. Consequently, this result also suggested that the non-apoptotic functions of BAX were more critical than its apoptotic function for cell survival in this particular assay. Similarly, it has been shown previously shown that BAX overexpression could protect neuron from growth factor withdrawal [49]. Finally, a BAX construct targeted to the nucleus elicited the opposite phenotype than *BAX* siRNA on cell proliferation. These results suggested strongly that the nuclear form of BAX could directly influence cell cycle progression.

With respect to BAX function in cell proliferation, a pioneer work published in 1996 showed that the proliferation rate of mature T cells overexpressing BAX in response to interleukin-2 was increased compared to control counterparts by decreasing the expression level of the cell cycle p27Kip1 [50]. More recently, Janumyan et al. showed that cell cycle progression was impaired in double *Bax*^{-/-} *Bak*^{-/-} MEF by an increase in the expression of total P27 and p27 phosphorylated at Ser(10) [4]. However, none of these studies investigated the possible involvement of the nuclear BAX in this process. We observed a similar upregulation of P-P27(Ser10) level in A549 cells and primary HLF using BAX siRNA only. BAK expression level was not perturbed in *BAX* siRNA treated cells compared to scramble siRNA controls (data not shown). In addition, we showed that BAX controlled also the expression of the cell cycle inhibitors P21 in both A549 cells and primary HLF as well as P16 in primary HLF only. Furthermore, the overexpression of nuclear BAX (NLS-BAX) decreased P21 expression in both cell types. Interestingly, the molecular mechanisms controlling P21 expression in A549 cells and primary HLF downstream of BAX seemed different. P21 upregulation correlated with an increase in P53 protein level in A549 cells treated with BAX

siRNA, while P53 expression was unchanged in primary HLF. The transcription factor P53 is well known to control P21 expression level in several cell types [23]. Meanwhile, BAX knock down correlated with an increase in *TGFbeta* mRNA expression in primary HLF. Interestingly, several studies have shown that TGF- β 1 positively regulates the expression of *P21* gene expression [51]. Furthermore, P21 overexpression is sufficient to induce the differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts in vitro [52]. Hence, the increased expression of the pro-fibrotic *TGF- β 1* and P21 could therefore explain the upregulation of myofibroblastic differentiation markers in *BAX* siRNA treated primary HLF. Furthermore, basal myofibroblastic differentiation of primary HLF seemed under the control of both cytosolic and nuclear forms of BAX. More precisely, we showed that the expression of α SMA, a smooth muscle marker, was under the control of BAX nuclear form (NLS-BAX construct). Meanwhile, our results suggested that BAX cytosolic form was also involved in the control of COL1 protein basal level in primary HLF.

Nuclear BAX is present in vivo in Human fetal, lung cancers and IPF.

In this study, we also showed that BAX nuclear localization was not observed only in vitro. BAX was detected within the nucleus of epithelial and mesenchymal cells in Human fetal lung undergoing major remodeling during the pseudoglandular stage. Meanwhile, few BAX positive nuclear cells were observed in the normal adult alveolar space. Interestingly, BAX nuclear staining was detected in epithelial lung tumors (adenocarcinoma and SLCL) and IPF lung sections as well. These deadly lung diseases have been both associated with aberrant recapitulation of developmental pathways and processes [8, 9, 27]. Few studies also reported BAX nuclear localization in human oral squamous cell carcinomas [53] and mouse acute pancreatitis [54]. Interestingly, epithelial lung tumors and the hyperplastic epithelium in IPF are proliferating structures [8, 9, 27]. In the light of the role of nuclear BAX in cell proliferation in vitro, it is tempting to speculate that nuclear BAX could be involved in the hyperproliferative epithelial cell growth observed in these diseases. Interestingly, it has been recently proposed that BAX non-apoptotic functions are critical for tumor

progression as complete inactivation of BAX locus is rarely observed in cancer, whereas mutations preventing its apoptotic function are quite frequent [5]. In addition, BAX was also observed in the nuclei of HLF organized in fibroblastic foci within IPF lung sections. The Fibroblast foci are a salient feature of this deadly fibrotic interstitial lung disease that still lacks efficient therapeutic approach [9, 27]. Hence, nuclear BAX could also participate to the control of the myofibroblastic differentiation state of HLF in IPF as suggested by our in vitro findings with NLS-BAX in HLF.

In conclusion, we think that BAX expression level in disease cannot be considered as a reliable readout for apoptosis response as this would undermine the contribution of BAX non-apoptotic functions in disease progression. Hence, our study suggests strongly nuclear BAX could play a critical role in basic cellular functions in non-dying cells in vitro and in disease progression as well.

Acknowledgments

We are very grateful to Prof. Joan Brugge at Harvard Medical School (Boston, MA USA) where this project was first initiated. We would also like to thank Prof Michael Overholtzer and Dr. Benoit Miotto for helpful discussions. This work was supported by the European Commission (FP7 project #202224, European Idiopathic Pulmonary Fibrosis Network), by the Angelran association and by grants from the CARDIF association, the LABEX « Inflammex » and the Chancellery of Paris Universities (Poix Legacy). S.B was supported by the “Mariane Josso” award (French Medical Research foundation, FRM) and by the French « Respiratory Health Research» endowment fund.

Material and methods

Human tissues samples.

Paraffin tissue arrays were purchased from US Biomax (Rockville, MD USA). Human fetal lung paraffin sections (12-week gestation) were obtained through the Bichat Hospital pathology department from elective terminations of normal pregnancies. IPF lung samples were obtained by open lung biopsy (n=5). IPF was diagnosed according to American Thoracic Society–European Respiratory Society consensus criteria [55] including characteristic morphology of usual interstitial pneumonia. Patients (4 men and a woman) were on average 60 years of age (range 51–65 years of age). 2 of them were ex-smokers and 2 were never smokers. Time elapsed to biopsy after the beginning of symptoms was 10.5 months (range, 2–189 months). At the time of lung biopsy, all patients were treated with oral prednisone. Control lung samples were obtained from non-involved segment for five patients (3 men and 2 women) undergoing lung surgery for removal of a primary lung tumor. The median age was 59 years (range 34–80 years). Two patients were never-smokers, one ex-smoker, and two active smokers. Written informed consent was obtained from all subjects.

Cell lines and cDNAs

All immortalized and transformed Human cell lines were obtained from ATCC (LGC Standard, Molsheim France) and cultured according to manufacturer recommendations. Mouse alveolar MLE-15 cells were a kind gift from Prof. Whitsett (Cincinnati OH, USA). Mouse primary lung fibroblasts were derived as previously described [56]. Primary Human lung fibroblasts from seven control patients were derived from human lung explants as previously described [57]. Primary Human lung fibroblasts (HLF) were cultured with Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics as previously described [57] and used at passage five.

NLS-BAX and NES-BAX plasmid cloned in pCDNA3.1 (Life Technology Invitrogen, St Quentin Fallavier France) were generated from a BAX- α backbone vector purchased from Origene

(Rockville MD, USA). PCR cloning approach was used as described in [58]. Two different primers were used to respectfully add 2 NES or 2 NLS sequence in 5' prime position of BAX-a cDNA. Meanwhile, a common primer was used to add FLAG and HA tags in 3' position (the primer sequences are described in table 1).

Cell culture experiments

For BAX knock down experiments with small interfering RNA (siRNA), cells were transfected at 50% to 60% of confluency in 6-well dishes. All transfection experiments were performed using the LipofectAMINE 2000 method (Invitrogen), in duplicate or triplicate, in accordance with the manufacturer's instructions. To suppress endogenous BAX expression, we used 2 specifics siRNA against BAX from Life Technology - Invitrogen (BAXHSS141355 and BAXHSS141356). SiRNA Negative Control MED GC (Invitrogen) was used as a negative control. A final concentration of 30nM siRNA was used for A549 cells, and of 50nM for control HLF. In myofibroblastic differentiation experiment, siRNA #1 and #2 were pooled to increase efficiency. A similar transfection protocol was used to overexpress Flag HA tagged NLS-BAX and NES-BAX constructs cloned in pCDNA3.1 vector. Empty pCDNA3.1 plasmid was used as control (2µg of plasmid were used for each transfection reaction).

Cell Growth was assayed 48h after siRNA BAX transfection. Cells were harvested through trypsinization and analysed for total cell number and dead cell population by trypan blue dye exclusion method by automatic cell viability analyzer (VI-CELL®, Beckman Coulter). Cell Cycle Analysis was performed as described in [59]. In the colony assay, 500 A549 cells were seeded in 6-well dishes overnight and then serum deprived for 5 days before recovery in full growth medium for 7 days. Cell colonies were stained with 1% Crystal violet staining solution in 70% ethanol for 5min before extensive washes in PBS. Photographs were taken with a Vilbert-Loumart apparatus and quantified with Image J software. For immunoblot and mRNA experiments, cells were plated in 6-well plates for 24h before stimulation transfection. The cells were cultured in full

growth medium at the exception of the primary HLF assayed for myofibroblastic markers. In these experiments, cells were cultured in serum-deprived medium for 48h after the transfection. For immunofluorescence, cells were cultured in full growth medium on Permanox™ Lab-Tek™ Chamber Slides (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA) as described elsewhere [60].

mRNA analysis

The mRNA from cell lines were extracted using NucleoSpin® RNA II kit according to manufacturer instructions (Macherey-Nagel GmbH & Co, Düren, Germany). The Reverse Transcription reaction was performed with 500ng of total RNA as described above. The transcripts of Ubiquitin C (UBC) served as endogenous RNA controls [60]. The results were expressed as gene of interest/UBC mRNA ratios. *P21*, *P53*, *α-SMA*, *α2-COL1* and *UBC* (see table 1 for sequence) expression were quantified by real-time polymerase chain reaction with a PCR ABI 7500 apparatus (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

Immunohistochemistry and Immunofluorescence

For immunohistochemistry (IHC), the paraffin-embedded sections were treated as described elsewhere [61]. The following primary antibodies were used for IHC: anti-BAX (Abcam ab54829 and ab7977) anti-HP1 gamma (abcam ab10480). The following primary antibodies were used for IF: anti-BAX (clone 6A7 abcam ab5714; BD Pharmingen #554104 (BH3 domain); Millipore AB1 PC66T (BH2 domain)), anti-LMN A/C (Scbt Sc-7293 and Sc-20681), H4ac (CST #2594), H3ac (CST #9671), H2Bac (CST #2574), anti-H3K4me3 (Diagenode MAb-152-050), anti-H3K27me3 (Diagenode MAb-181-050), anti-HP1 gamma (abcam ab10480), anti-H3K9me3 (abcam Ab8890), anti-H3K36me3 (abcam Ab9050), anti-P53 (clone DO1, abcam Ab80645), anti-TBP (abcam Ab51841), anti-KU70 (abcam Ab2172), anti-BCL2 (Sbct Sc-509), anti-FBL (Scbt Sc-166001), anti-BAK (Abcam Ab1542-1), anti-BCLxL (CST #2764) and Phalloidin coupled with

alexa568 dye (Invitrogen). BAX nuclear staining with anti-BAX 6A7 clone after Triton X-100 or CHAPS treatment was performed as described previously [12]. Proximity ligation assay was performed accordingly to manufacturer protocol (Duolink assay with Reagent Green, Olink Biosciences, Uppsalla, Sweden). To test the specificity of immunostaining, antibodies were omitted or replaced by an isotype-matched control antibody. All digital images of light microscopy were acquired with a DM400B microscope (Leica) equipped with a Leica DFC420 CDD camera. Digital images of immunofluorescence were acquired with an IX70 fluorescence microscope (Olympus) equipped with X-cite Q source and an ORCA-03G CCD camera (Hamamatsu) with Cell-A software (Olympus).

Protein analysis

Primary fibroblasts in culture were lysed on ice in RIPA buffer (10mM Tris-HCl pH8, 50mM NaCl, 0.5% Na deoxycholate, 0.2% SDS, 1% NP-40), supplemented with protease inhibitor cocktail inhibitor (10µg/ml aprotinin, 10µg/ml leupeptin, 8.3µg/ml pepstatin A, 2mM PMSF). Lysates were clarified by centrifugation (13,000 g for 20 min at 4°C). 10-30µg samples were analysed by western blot experiments described in [58]. Histone association assay was adapted from [14] using Dithiobis[succinimidyl propionate] (DSP) as crosslinker (200µg/ml for 10min at room temperature; Pierce, Rockford IL USA). Histone immunoprecipitation was performed as described in [14] using 1mg of protein extracts with 2µg of anti-Histone H2B (Abcam Ab1790) or control IgG (Abcam Ab171870). Cell fractionation was performed according to manufacturer instructions (Nuclear/Cytosol Fractionation Kit, Biovision, Milpitas CA USA). BAX differential extraction protocol was adapted from [15] using Micrococcal nuclease (MNase) to digest chromatin bulks (10U/ml 20min 37°C; Pierce, Rockford IL USA). The following primary antibodies were used for immunoblotting: anti-BAX (Scbt Sc-493), anti-histone H3 (CST #4499), anti-HP1γ (Abcam Ab56978), anti-P21 (Scbt sc-397), anti-P27 (Abcam Ab1591-1), anti-phosphoP27(S10) (Abcam Ab2184-1), anti-P16 (Scbt sc-467), anti-P53 (clone DO1, abcam Ab80645), anti-Lamin B1 (Abcam

Ab16048), anti- β -Tubulin (Abcam Ab6046), anti- α -SMA (Sigma-Aldrich, clone 1A4, #A2547), anti-Collagen Type 1 (SouthernBiotech, #1310-01), anti-Fibronectin-1 (Abcam, ab23750) and GAPDH (Abcam, ab9485),

Statistical analysis

All data were expressed as or mean (with standard error of the mean) values as described in figure legends. Statistical analysis was performed with Prism 5 (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA USA). P values less than 0.05 were considered as significant.

REFERENCES

1. Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 18, 157-164.
2. Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.
3. Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C., and Kroemer, G. Non-apoptotic functions of apoptosis-regulatory proteins. *EMBO Rep* 13, 322-330.
4. Janumyan, Y., Cui, Q., Yan, L., Sansam, C.G., Vanlentin, M., and Yang, E. (2008). G0 function of BCL2 and BCL-xL requires BAX, BAK, and p27 phosphorylation by Mirk, revealing a novel role of BAX and BAK in quiescence regulation. *J Biol Chem*.
5. Boohaker, R.J., Zhang, G., Carlson, A.L., Nemec, K.N., and Khaled, A.R. (2011). BAX supports the mitochondrial network, promoting bioenergetics in nonapoptotic cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 300, C1466-1478.
6. Hoetelmans, R., van Slooten, H.J., Keijzer, R., Erkeland, S., van de Velde, C.J., and Dierendonck, J.H. (2000). Bcl-2 and Bax proteins are present in interphase nuclei of mammalian cells. *Cell Death Differ* 7, 384-392.
7. Salah-eldin, A., Inoue, S., Tsuda, M., and Matsuura, A. (2000). Abnormal intracellular localization of Bax with a normal membrane anchor domain in human lung cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res* 91, 1269-1277.
8. Strasser, A., Cory, S., and Adams, J.M. (2011). Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *Embo J* 30, 3667-3683.
9. Fernandez, I.E., and Eickelberg, O. (2012). New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 380, 680-688.
10. Hardwick, J.M., and Soane, L. (2013). Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
11. Kilbride, S.M., and Prehn, J.H. (2013). Central roles of apoptotic proteins in mitochondrial function. *Oncogene* 32, 2703-2711.
12. Yethon, J.A., Epand, R.F., Leber, B., Epand, R.M., and Andrews, D.W. (2003). Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis. *J Biol Chem* 278, 48935-48941.
13. Hsu, Y.T., and Youle, R.J. (1998). Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* 273, 10777-10783.

14. Ricke, R.M., and Bielinsky, A.K. (2005). Easy detection of chromatin binding proteins by the Histone Association Assay. *Biol Proced Online* 7, 60-69.
15. Fujita, M., Ishimi, Y., Nakamura, H., Kiyono, T., and Tsurumi, T. (2002). Nuclear organization of DNA replication initiation proteins in mammalian cells. *J Biol Chem* 277, 10354-10361.
16. Dechat, T., Adam, S.A., Taimen, P., Shimi, T., and Goldman, R.D. Nuclear lamins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000547.
17. Soderberg, O., Leuchowius, K.J., Gullberg, M., Jarvius, M., Weibrecht, I., Larsson, L.G., and Landegren, U. (2008). Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. *Methods* 45, 227-232.
18. Kimura, H. (2013). Histone modifications for human epigenome analysis. *J Hum Genet* 58, 439-445.
19. Kwon, S.H., and Workman, J.L. (2011). The changing faces of HP1: From heterochromatin formation and gene silencing to euchromatic gene expression: HP1 acts as a positive regulator of transcription. *Bioessays* 33, 280-289.
20. Johnson, S.A., Dubeau, L., White, R.J., and Johnson, D.L. (2003). The TATA-binding protein as a regulator of cellular transformation. *Cell Cycle* 2, 442-444.
21. Amsel, A.D., Rathaus, M., Kronman, N., and Cohen, H.Y. (2008). Regulation of the proapoptotic factor Bax by Ku70-dependent deubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5117-5122.
22. Shimi, T., Butin-Israeli, V., Adam, S.A., and Goldman, R.D. Nuclear lamins in cell regulation and disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 75, 525-531.
23. He, G., Siddik, Z.H., Huang, Z., Wang, R., Koomen, J., Kobayashi, R., Khokhar, A.R., and Kuang, J. (2005). Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene* 24, 2929-2943.
24. Kaldis, P. (2007). Another piece of the p27Kip1 puzzle. *Cell* 128, 241-244.
25. Schreiber, M., Muller, W.J., Singh, G., and Graham, F.L. (1999). Comparison of the effectiveness of adenovirus vectors expressing cyclin kinase inhibitors p16INK4A, p18INK4C, p19INK4D, p21(WAF1/CIP1) and p27KIP1 in inducing cell cycle arrest, apoptosis and inhibition of tumorigenicity. *Oncogene* 18, 1663-1676.
26. Lange, A., Mills, R.E., Lange, C.J., Stewart, M., Devine, S.E., and Corbett, A.H. (2007). Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem* 282, 5101-5105.
27. King, T.E., Jr., Pardo, A., and Selman, M. (2011). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 378, 1949-1961.

28. Plantier, L., Crestani, B., Wert, S.E., Dehoux, M., Zweytick, B., Guenther, A., and Whitsett, J.A. (2011). Ectopic respiratory epithelial cell differentiation in bronchiolised distal airspaces in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 66, 651-657.
29. Gill, M.B., Bockhorst, K., Narayana, P., and Perez-Polo, J.R. (2008). Bax shuttling after neonatal hypoxia-ischemia: hyperoxia effects. *J Neurosci Res* 86, 3584-3604.
30. Lopez, E., Pozas, E., Rivera, R., and Ferrer, I. (1999). Bcl-2, Bax and Bcl-x expression following kainic acid administration at convulsant doses in the rat. *Neuroscience* 91, 1461-1470.
31. Raffo, A.J., Kim, A.L., and Fine, R.L. (2000). Formation of nuclear Bax/p53 complexes is associated with chemotherapy induced apoptosis. *Oncogene* 19, 6216-6228.
32. Joy, A., Panicker, S., and Shapiro, J.R. (2000). Altered nuclear localization of bax protein in BCNU-resistant glioma cells. *J Neurooncol* 49, 117-129.
33. Mandal, M., Adam, L., Mendelsohn, J., and Kumar, R. (1998). Nuclear targeting of Bax during apoptosis in human colorectal cancer cells. *Oncogene* 17, 999-1007.
34. Thielmann, H.W., Popanda, O., and Staab, H.J. (1999). Subnuclear distribution of DNA topoisomerase I and Bax protein in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts after irradiation with UV light and gamma rays or treatment with topotecan. *J Cancer Res Clin Oncol* 125, 193-208.
35. Nishita, M., Inoue, S., Tsuda, M., Tateda, C., and Miyashita, T. (1998). Nuclear translocation and increased expression of Bax and disturbance in cell cycle progression without prominent apoptosis induced by hyperthermia. *Exp Cell Res* 244, 357-366.
36. Yamamoto, C.M., Sinha Hikim, A.P., Huynh, P.N., Shapiro, B., Lue, Y., Salameh, W.A., Wang, C., and Swerdloff, R.S. (2000). Redistribution of Bax is an early step in an apoptotic pathway leading to germ cell death in rats, triggered by mild testicular hyperthermia. *Biol Reprod* 63, 1683-1690.
37. Kihlmark, M., Rustum, C., Eriksson, C., Beckman, M., Iverfeldt, K., and Hallberg, E. (2004). Correlation between nucleocytoplasmic transport and caspase-3-dependent dismantling of nuclear pores during apoptosis. *Exp Cell Res* 293, 346-356.
38. Lindenboim, L., Blacher, E., Borner, C., and Stein, R. Regulation of stress-induced nuclear protein redistribution: a new function of Bax and Bak uncoupled from Bcl-x(L). *Cell Death Differ* 17, 346-359.
39. Tripathi, S., Batra, J., Cao, W., Sharma, K., Patel, J.R., Ranjan, P., Kumar, A., Katz, J.M., Cox, N.J., Lal, R.B., et al. Influenza A virus nucleoprotein induces apoptosis in human airway epithelial cells: implications of a novel interaction between nucleoprotein and host protein Clusterin. *Cell Death Dis* 4, e562.

40. Bartholomeusz, G., Wu, Y., Ali Seyed, M., Xia, W., Kwong, K.Y., Hortobagyi, G., and Hung, M.C. (2006). Nuclear translocation of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bok induces apoptosis. *Mol Carcinog* 45, 73-83.
41. Ko, J.K., Lee, M.J., Cho, S.H., Cho, J.A., Lee, B.Y., Koh, J.S., Lee, S.S., Shim, Y.H., and Kim, C.W. (2003). Bfl-1S, a novel alternative splice variant of Bfl-1, localizes in the nucleus via its C-terminus and prevents cell death. *Oncogene* 22, 2457-2465.
42. Gajkowska, B., Motyl, T., Olszewska-Badarczuk, H., Gniadecki, R., and Koronkiewicz, M. (2000). Structural association of Bax with nuclear matrix and cytomatrix revealed by embedment-free immunogold electron microscopy. *Cell Biol Int* 24, 649-656.
43. Choi, Y.B., and Nicholas, J. Bim nuclear translocation and inactivation by viral interferon regulatory factor. *PLoS Pathog* 6, e1001031.
44. Trisciuglio, D., Gabellini, C., Desideri, M., Ziparo, E., Zupi, G., and Del Bufalo, D. Bcl-2 regulates HIF-1alpha protein stabilization in hypoxic melanoma cells via the molecular chaperone HSP90. *PLoS One* 5, e11772.
45. Laulier, C., and Lopez, B.S. The secret life of Bcl-2: apoptosis-independent inhibition of DNA repair by Bcl-2 family members. *Mutat Res* 751, 247-257.
46. Fujise, K., Zhang, D., Liu, J., and Yeh, E.T. (2000). Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* 275, 39458-39465.
47. Jamil, S., Sobouti, R., Hojabrpour, P., Raj, M., Kast, J., and Duronio, V. (2005). A proteolytic fragment of Mcl-1 exhibits nuclear localization and regulates cell growth by interaction with Cdk1. *Biochem J* 387, 659-667.
48. Koehler, B.C., Scherr, A.L., Lorenz, S., Urbanik, T., Kautz, N., Elssner, C., Welte, S., Bermejo, J.L., Jager, D., and Schulze-Bergkamen, H. Beyond cell death - antiapoptotic bcl-2 proteins regulate migration and invasion of colorectal cancer cells in vitro. *PLoS One* 8, e76446.
49. Middleton, G., Nunez, G., and Davies, A.M. (1996). Bax promotes neuronal survival and antagonises the survival effects of neurotrophic factors. *Development* 122, 695-701.
50. Brady, H.J., Gil-Gomez, G., Kirberg, J., and Berns, A.J. (1996). Bax alpha perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells. *Embo J* 15, 6991-7001.
51. Pardali, K., Kurisaki, A., Moren, A., ten Dijke, P., Kardassis, D., and Moustakas, A. (2000). Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 275, 29244-29256.
52. Roy, S., Khanna, S., Rink, T., Radtke, J., Williams, W.T., Biswas, S., Schnitt, R., Strauch, A.R., and Sen, C.K. (2007). P21waf1/cip1/sdi1 as a central regulator of inducible smooth

- muscle actin expression and differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Mol Biol Cell* 18, 4837-4846.
53. Bose, P., Klimowicz, A.C., Kornaga, E., Petrillo, S.K., Matthews, T.W., Chandarana, S., Magliocco, A.M., Brockton, N.T., and Dort, J.C. Bax expression measured by AQUAnalysis is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 12, 332.
 54. Gomez, G., Lee, H.M., He, Q., Englander, E.W., Uchida, T., and Greeley, G.H., Jr. (2001). Acute pancreatitis signals activation of apoptosis-associated and survival genes in mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 226, 692-700.
 55. (2002). American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 277-304.
 56. Seluanov, A., Vaidya, A., and Gorbunova, V. (2010). Establishing primary adult fibroblast cultures from rodents. *J Vis Exp*.
 57. Marchand-Adam, S., Plantier, L., Bernuau, D., Legrand, A., Cohen, M., Marchal, J., Soler, P., Leseche, G., Mal, H., Aubier, M., et al. (2005). Keratinocyte growth factor expression by fibroblasts in pulmonary fibrosis: poor response to interleukin-1beta. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32, 470-477.
 58. Schmelzle, T., Mailleux, A.A., Overholtzer, M., Carroll, J.S., Solimini, N.L., Lightcap, E.S., Veiby, O.P., and Brugge, J.S. (2007). Functional role and oncogene-regulated expression of the BH3-only factor Bmf in mammary epithelial anoikis and morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 3787-3792.
 59. Krishan, A. (1975). Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* 66, 188-193.
 60. Itzykson, R., Thepot, S., Quesnel, B., Dreyfus, F., Beyne-Rauzy, O., Turlure, P., Vey, N., Recher, C., Dartigeas, C., Legros, L., et al. (2011). Prognostic factors for response and overall survival in 282 patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. *Blood* 117, 403-411.
 61. Pena, A.M., Fabre, A., Debarre, D., Marchal-Somme, J., Crestani, B., Martin, J.L., Beaurepaire, E., and Schanne-Klein, M.C. (2006). Three-dimensional investigation and scoring of extracellular matrix remodeling during lung fibrosis using multiphoton microscopy. *Microsc Res Tech*.

Table

Gene	Primer Sequences (5' to 3')	
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>h-UBC</i>	CACTTGGTCCTGCGCTTGA	TTTTTTGGGAATGCAACAACCTT
<i>h- SMA</i>	GAAGAGCATCCCACCCTGC	ATTTTCTCCCGGTGGCCT
<i>h-FN1</i>	TGCCAACAGGATGACATGAAT	CATACCCGCCGAATGTAGGA
<i>h-COL1A2</i>	TTGAGACTCAGCCACCCAGAGT	CAGTTCTTGGCTGGGATGTTTT
<i>h-P21</i>	GCAGCTGCCGAAGTCAGTTCCT	TTCTGACATGGCGCCTCCTCTGA
<i>h-P53</i>	TTCCCTGGATTGGCAGCCAGAC	ACGCTAGGATCTGACTGCGGCT
<i>h-P16</i>	GCTGCCCAACGCACCGAATAGT	TCATCATGACCTGGATCGGCCTCC
<i>h-P27</i>	GCGACCTGCAACCGACGATTCT	AGAACCGGCATTTGGGGAACCG
NLS-BAX-fw	GAATTCCCACCATGCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTAGATCCAAAAAAGAA GAGAAAGGTAATGGACGGGTCCGGGGAG	
NES-BAX-fw	GAATTCCCACCATGCTTCCTCCTCTTGAACGTCTTACTCTTGATCTTCCTCC TCTTGAACGTCTTACTTTGATATGGACGGGTCCGGGGAG	
HAFLAG-BAX-Rv	TGAGTGGTAGACCTTCTTCTACCCGCTAATGTTTCCTACTGCTGCTATTCCC ACTAATGTTTCCTACTGCTGCTATTCTAGCTAATGTTTCCTACTGCTGCTATT CATCGAGCTC	

Table1 : Primer sequences for PCR and cloning.

Figures

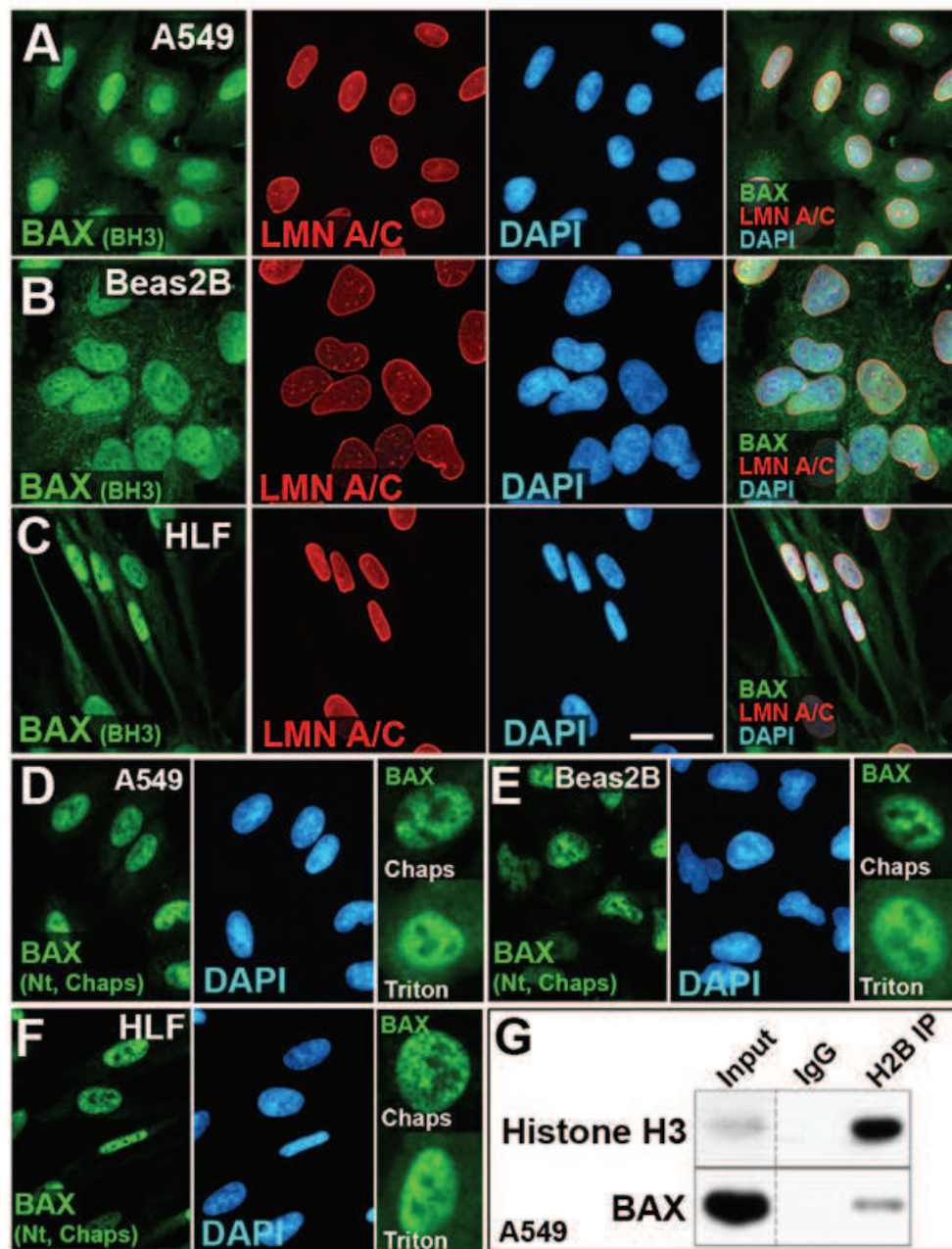


Figure 1 : BAX is present in an opened conformation in the interphasic nucleus of lung cell types.

(A-C) Immunofluorescence for BAX with an antibody against an epitope next to the BH3 domain (green), Lamin A/C showing the nuclear envelop (red) and DAPI (blue) and merge in (A) A549, (B) Beas2B and (C) primary HLF. Note the cytosolic and nuclear BAX localization in all three cell-types. (D-F) Immunofluorescence for BAX with an antibody against an the Nt part of BAX (green), Lamin A/C (red) and DAPI (blue) and merge in (D) A549, (E) Beas2B and (F) primary HLF permeabilized with Chaps. The inserts show BAX staining in triton or chaps treated cells. (G)

Immunoblot showing the interaction of BAX with the chromatin component histone H2B after H2B immunoprecipitation (histone association assay). Histone H3 was used as a positive control. Scale Bar : 10 μ M

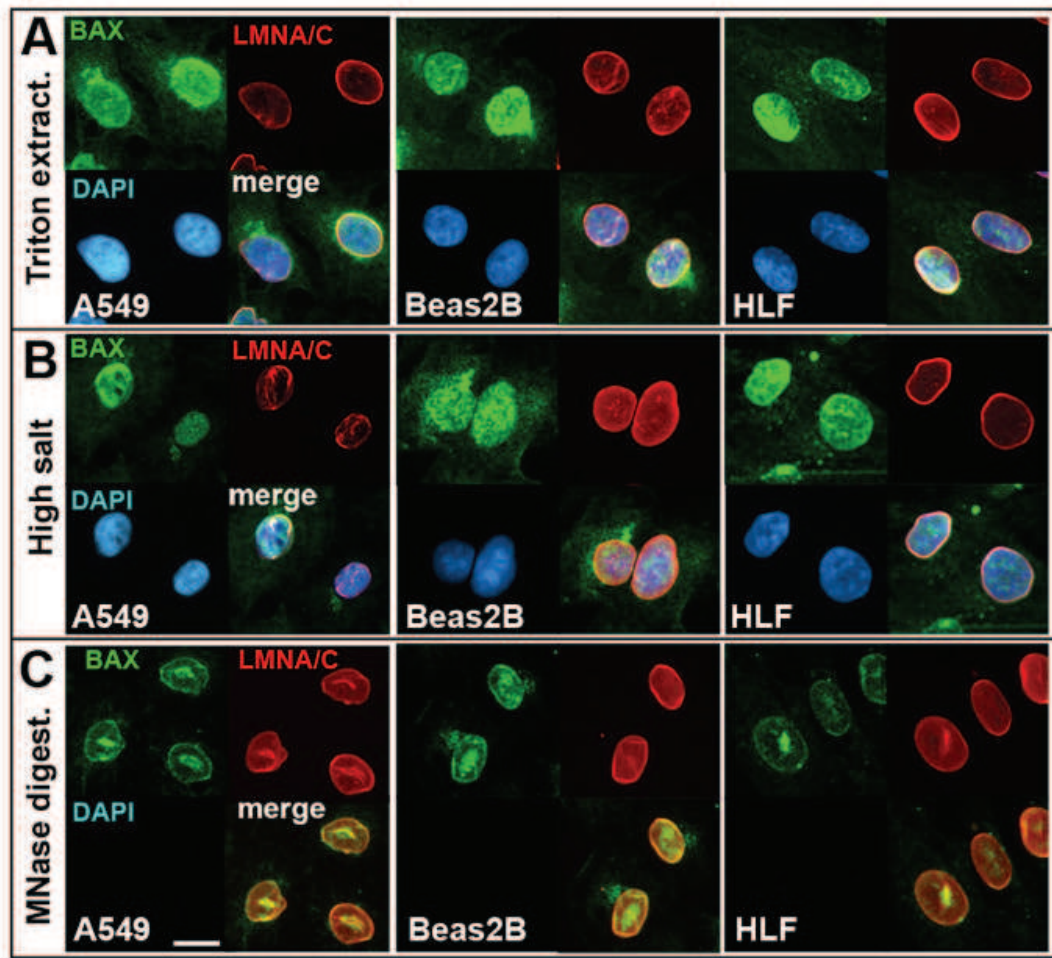


Figure 2 : differential extraction of BAX in DSP crosslinked lung cell types

Immunofluorescence for BAX (green), Lamin A/C showing the nuclear envelop (red) and DAPI (blue) and merge in A549 (left panel), Beas2B (middle panel) and primary HLF (right panel) after (A) extraction with Triton CSK buffer followed by (B) extraction with 0.5M NaCl buffer and finally (C) digestion of chromatin bulks with Micrococcal nuclease (MNase). Note the absence of DAPI staining in C. Scale bar: 8 μ m.

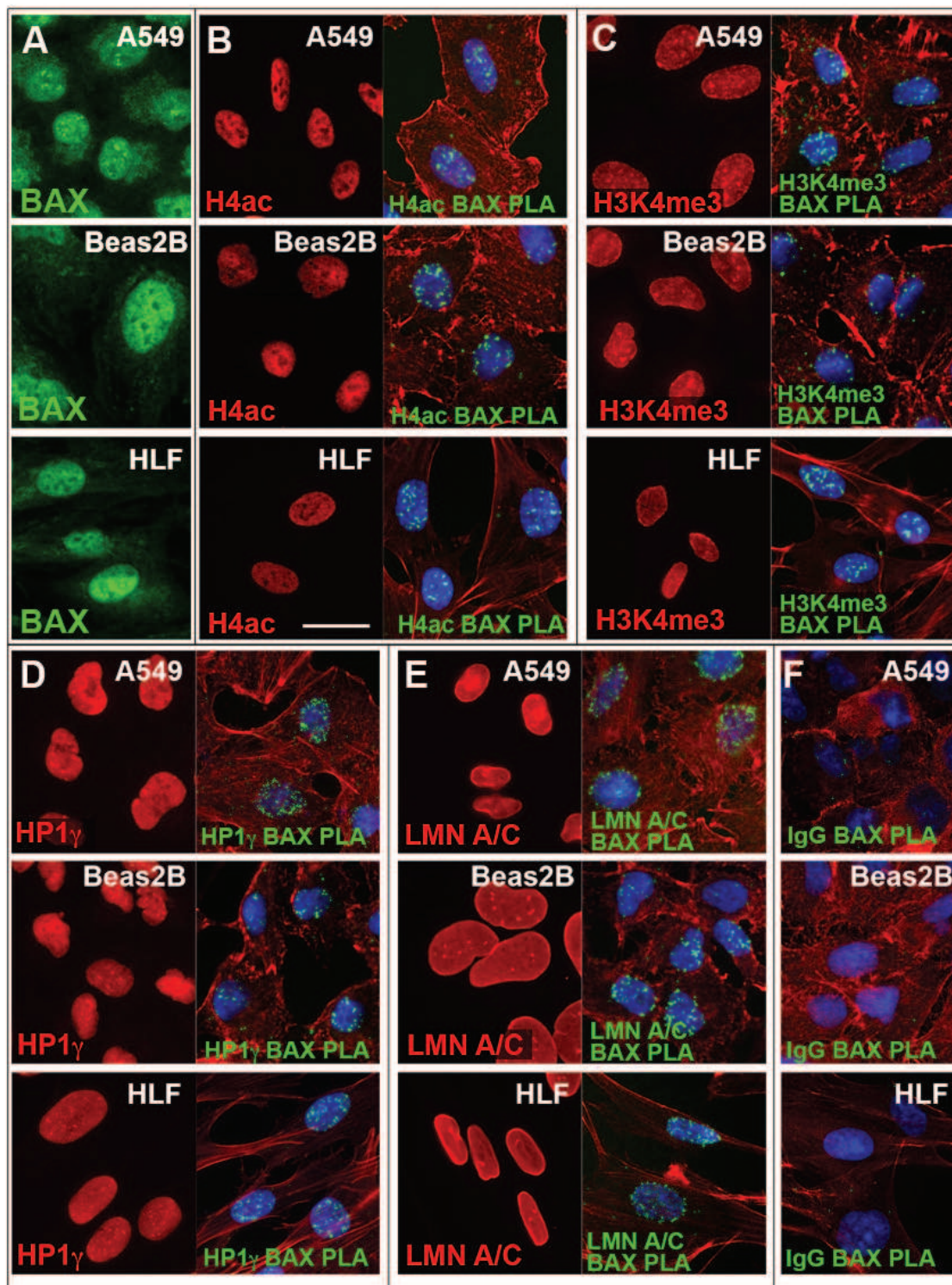


Figure 3 : BAX is in close proximity with chromatin in A549, Beas2B cells and primary HLF. (A) BAX immunofluorescence (green) in A549 (upper panel), Beas2B (middle panel) and primary HLF (lower panel). (B) Immunofluorescence showing H4ac (red) nuclear staining in A549 (upper left panel), Beas2B (middle left panel) and primary HLF (lower left panel). The right panels display the corresponding PLA with BAX and H4ac (green dots). (C) Immunofluorescence showing

H3K4me3 (red) nuclear staining in A549 (upper left panel), Beas2B (middle left panel) and primary HLF (lower left panel). The right panels display the corresponding PLA with BAX and H3K4me3 (green dots). **(D)** Immunofluorescence showing HP1 γ (red) nuclear staining in A549 (upper left panel), Beas2B (middle left panel) and primary HLF (lower left panel). The right panels display the corresponding PLA with BAX and HP1 γ (green dots). **(E)** Immunofluorescence showing Lamin A/C (red) nuclear staining in A549 (upper left panel), Beas2B (middle left panel) and primary HLF (lower left panel). The right panels display the corresponding PLA with BAX and LMN A/C (green dots). **(F)** Immunofluorescence showing PLA performed with BAX antibody and a control isotype IgG in A549 (upper left panel), Beas2B (middle left panel) and primary HLF (lower left panel). In panel F and all the panels on the right in B, C, D and E , the nuclei are counterstained with DAPI (blue) and actin fibers are revealed with Phalloidin staining (red). Note the nuclear localization of the PLA / green dots in the right panels of B, C, D and E and the absence of green dots in IgG control (F). Scale Bar : 10 μ M

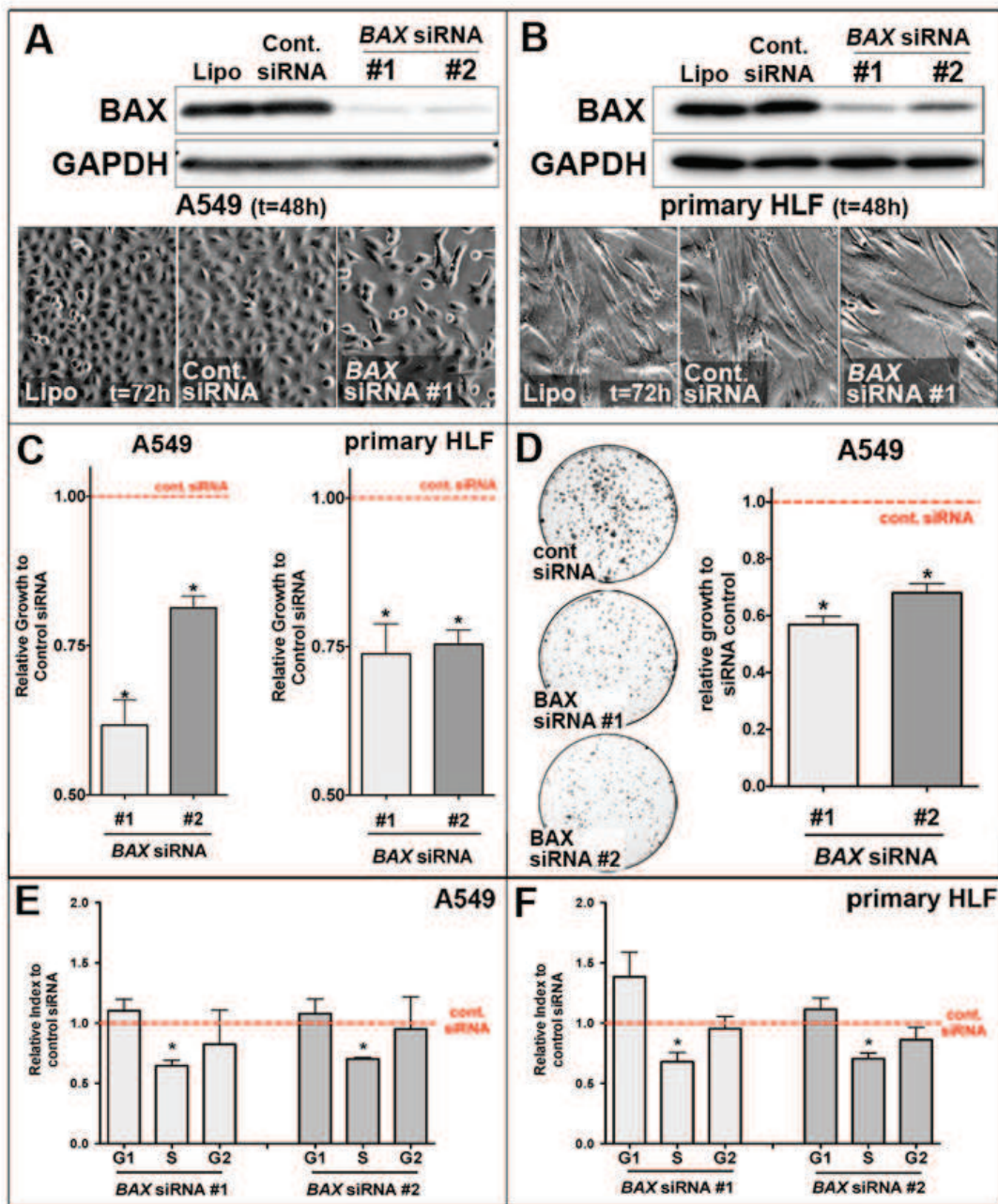


Figure 4: effects of BAX knock down of A549 and primary HLF proliferation in vitro.

(A) A549 cells or (B) primary HLF were treated with the transfection reagent alone (Lipofectamine, Lipo.) or transfected with a non-targeting siRNA (Cont. siRNA) or two different *BAX* siRNA sequences for 48h. Immunoblot was revealed with an anti-BAX antibody and GAPDH as loading control. Phase contrast pictures of cells transfected with control Lipofectamine alone (Lipo, left panel), control siRNA (Cont. siRNA, middle panel) and BAX siRNA #1 (right panel) suggest a decreased in proliferation in BAX siRNA #1 treated cells. Similar results were observed with BAX siRNA #2 (data not shown). (C) Effects of *BAX* siRNA #1 and #2 on the proliferation (cell count) of A549 cells (left panel, n=7) and primary HLF (right panel, n=7) compared to cells treated with

control siRNA (red dashed line) at 48h (* $p < 0.05$, Wilcoxon rank t-Test). **(D)** Clonogenic assay performed with A549 cells transfected with control siRNA or with two different BAX siRNA. Pictures of violet crystal stained colony assay of A549 cells after 5 days of serum starvation and 7 days of recovery in complete medium are showed on the left (500 cells were initially plated). Quantification of images from three independent experiments after crystal violet staining are showed on the right. Note the growth inhibition in *BAX* siRNA A549 cells compared to controls. (* $p < 0.05$, rank t-Test). **(E-F)** Cell cycle analysis by FACS analysis of DNA content FAC (PI method) in **(E)** A549 cells (n=3) or **(F)** primary HLF (n=3) transfected with two different BAX siRNA compared to control siRNA (red dash line). Note the decreased in S phase in *BAX* siRNA treated cells (* $p < 0.05$, rank t-Test). Scale: 20 μ m (A and B).

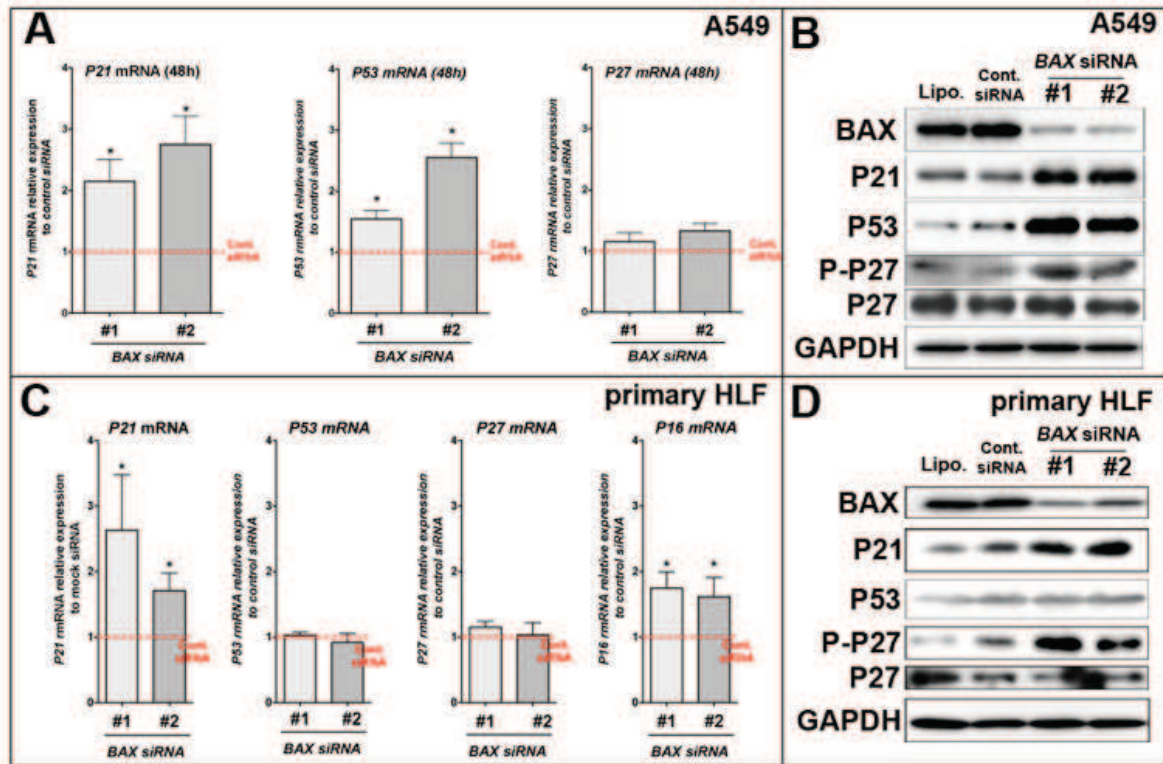


Figure 5: effects of BAX knock down on the expression cell cycle regulators in A549 and primary HLF in vitro.

(A) Expression of *P21* (left panel), *P53* (middle panel) and *P27* (right panel) mRNA by qPCR in A549 cells transfected for 48h with two different *BAX* siRNA compared to siRNA control (red dash line, n=6 experiments). (B) Representative immunoblot (n=5) of BAX, P21, P53, P-P27(S10) protein level in A549 cells treated with lipofectamine alone, control siRNA (cont siRNA) and two different *BAX* siRNA (#1 and #2). GAPDH was used as loading control. (C) Expression of *P21* (left panel), *P53* (middle panel) and *P27* (right panel) mRNA by qPCR in primary HLF transfected for 48h with two different *BAX* siRNA compared to siRNA control (red dash line, n=6 experiments). (D) Representative immunoblot of BAX, P21, P53, P-P27(S10) and total P27 protein level in primary HLF treated with lipofectamine alone, control siRNA (cont siRNA) and two different *BAX* siRNA (#1 and #2). GAPDH was used as loading control. (* $p < 0.05$, Wilcoxon rank t-Test).

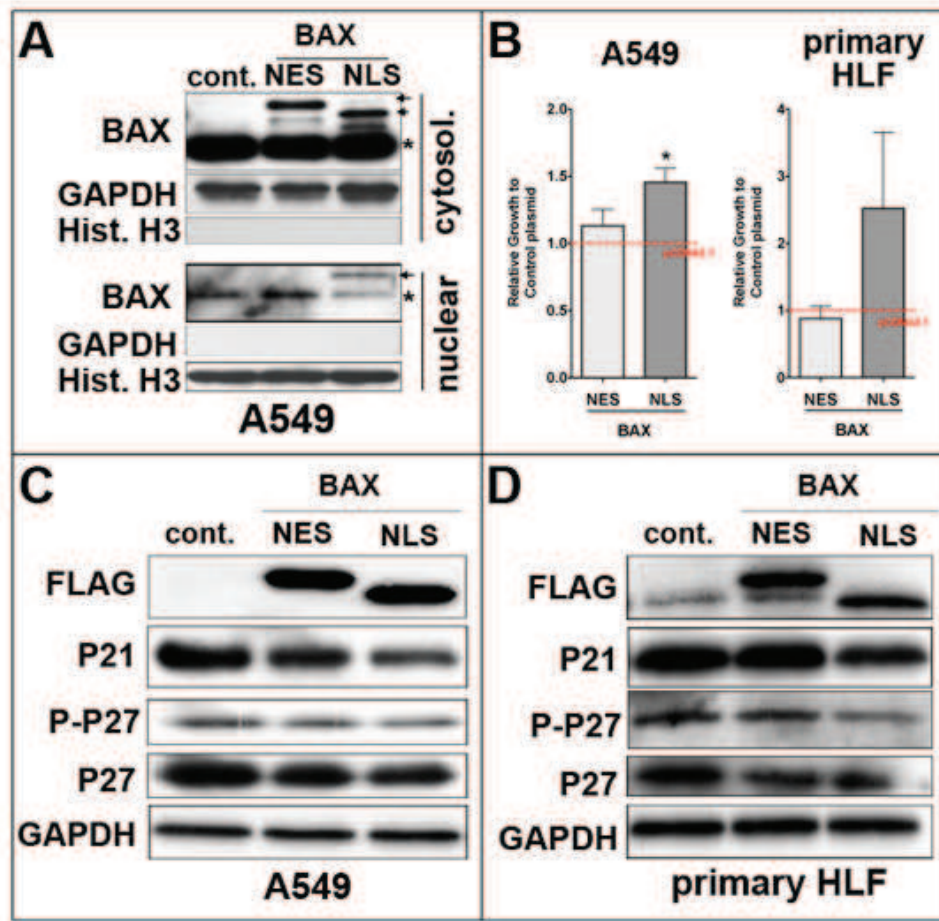


Figure 6: Gain-on function experiments with BAX proteins targeted either to the nucleus (NLS-BAX) or excluded from the nucleus (NES-BAX) in A549 cells and primary HLF.

(A) Immunoblot after subcellular fractionation in A549 cells transfected for 48h with an empty pCDNA 3.1 vector, NES-BAX or NLS-BAX constructs. The upper panel shows that NES-BAX (upper arrow) and NLS-BAX (lower arrow) are detected at higher molecular weight than endogenous BAX (asterisks) in the cytosolic fraction (revealed with GAPDH antibody). In the nuclear fraction (revealed with Histone H3), only NLS-BAX was detected (arrow) above endogenous nuclear BAX (lower panel). (B) Effects of NES and NLS-BAX on the proliferation (cell count) of A549 cells (left panel, n=3) and primary HLF (right panel, n=3) compared to cells treated with control plasmid (red dashed line) at 48h. Note that the increase in cell proliferation was observed only in NLS-BAX transfected cells (* $p < 0.05$, rank t-Test). (C-D) Representative immunoblot (n=3) of FLAG tagged overexpressed BAX, P21, P-P27(S10) and total P27 protein level in A549 cells (C) or primary HLF (D) transfected with empty control vector, either NES-BAX or NLS-BAX constructs for 48h. GAPDH was used as loading control.

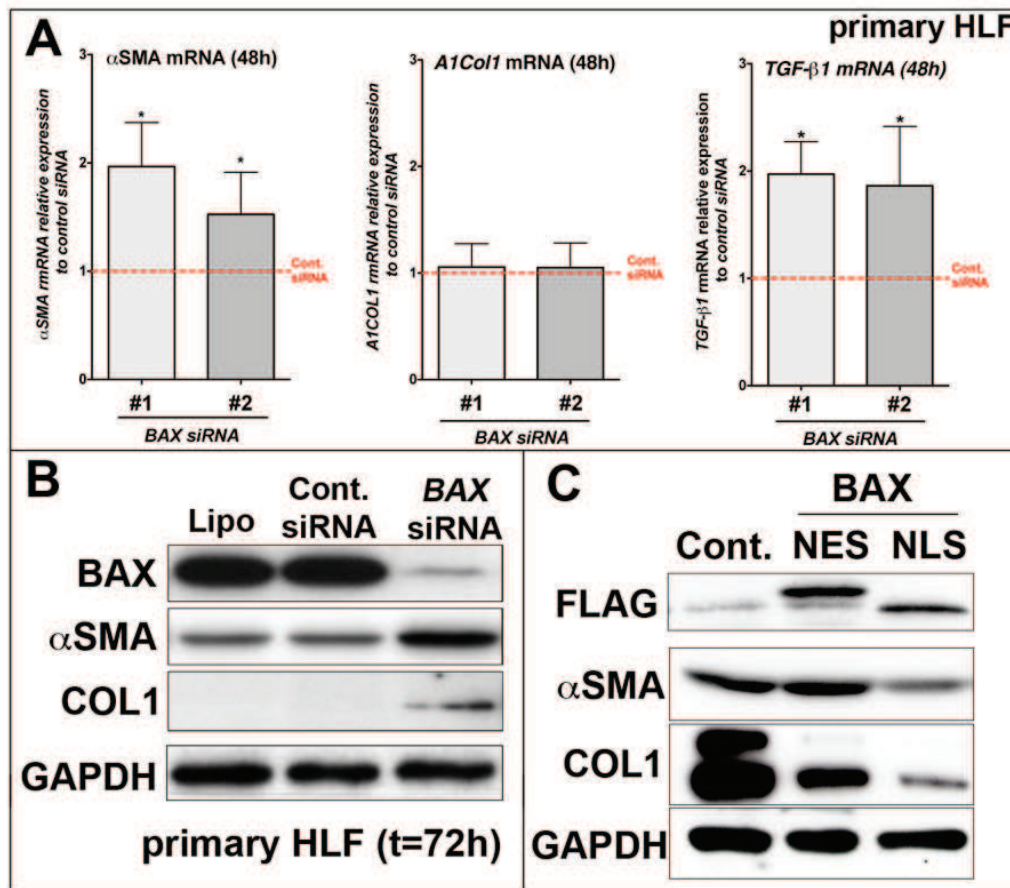


Figure 7: Effect of BAX knock down or NES-, NLS-BAX gains of function on the basal myofibroblastic differentiation state of primary HLF in vitro.

(A) Expression of α SMA (left panel), *A1COL1* (middle panel) and *TGF- β 1* (right panel) mRNA by qPCR in primary HLF transfected for 48h with two different *BAX* siRNA compared to siRNA control (red dash line, n=6 experiments). Note the increase expression of α SMA and *TGF- β* mRNA in primary HLF treated with *BAX* siRNA. (B) Representative immunoblot (n=5) of BAX, α SMA, COL1 protein levels in A primary cells treated with lipofectamine alone, control siRNA (cont siRNA) and two different *BAX* siRNA pooled to increase efficiency. GAPDH was used as loading control. Note the increase expression of α SMA and COL1 protein in *BAX* siRNA treated HLF. (C) Representative immunoblot (n=3) of FLAG tagged overexpressed *BAX* constructs, α SMA and COL1 proteins in primary HLF transfected with empty control vector, either NES-*BAX* or NLS-*BAX* constructs for 48h. GAPDH was used as loading control. A decrease in α SMA protein level was observed only in NLS-*BAX* transfected cells, while α 1 and α 2 Collagen-1 isoforms levels were decreased with both NES- and NLS-*BAX* constructs. Note that the COL1 blot in panel C was exposed longer than the one in panel B (* p<0.05, Wilcoxon rank t-Test).

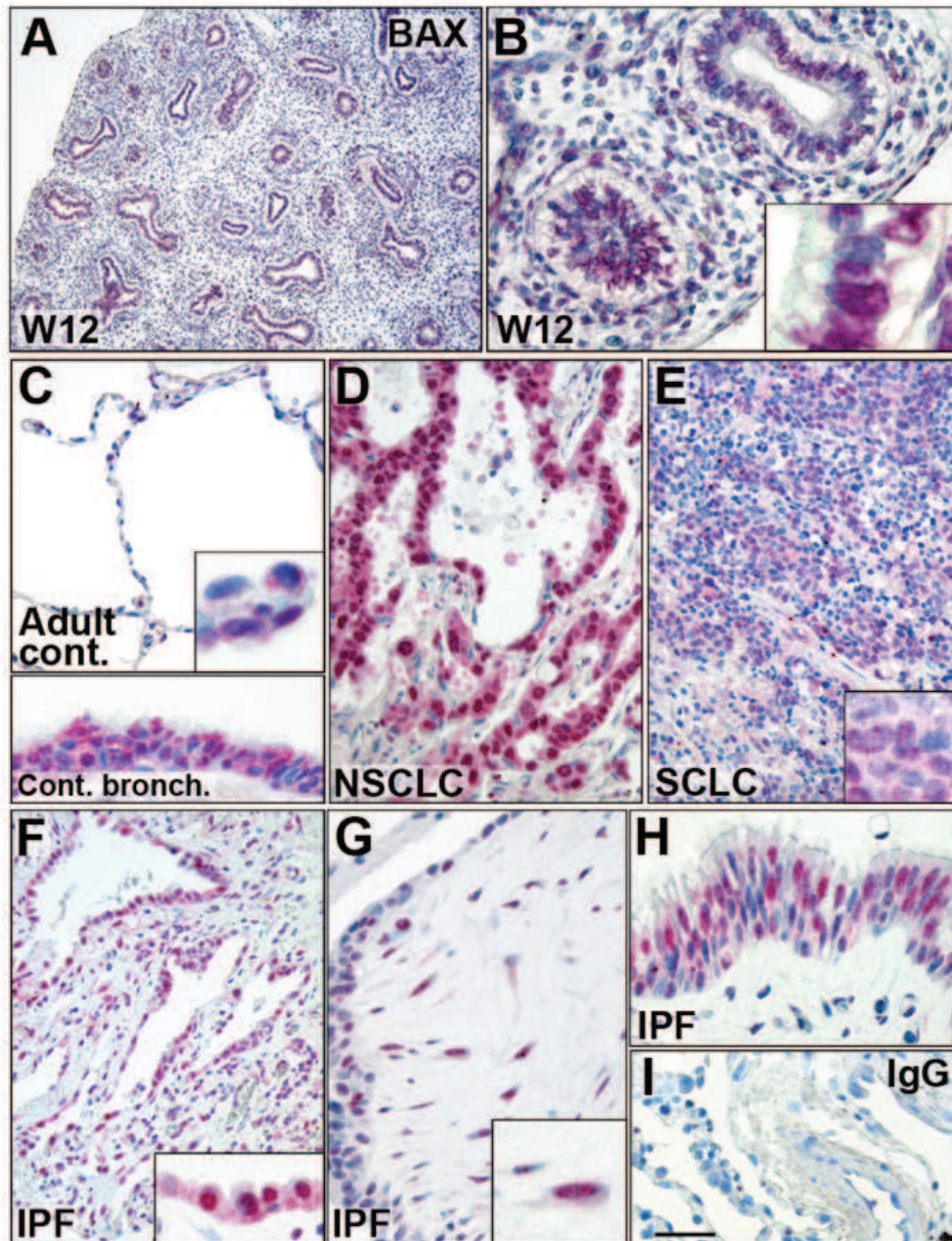
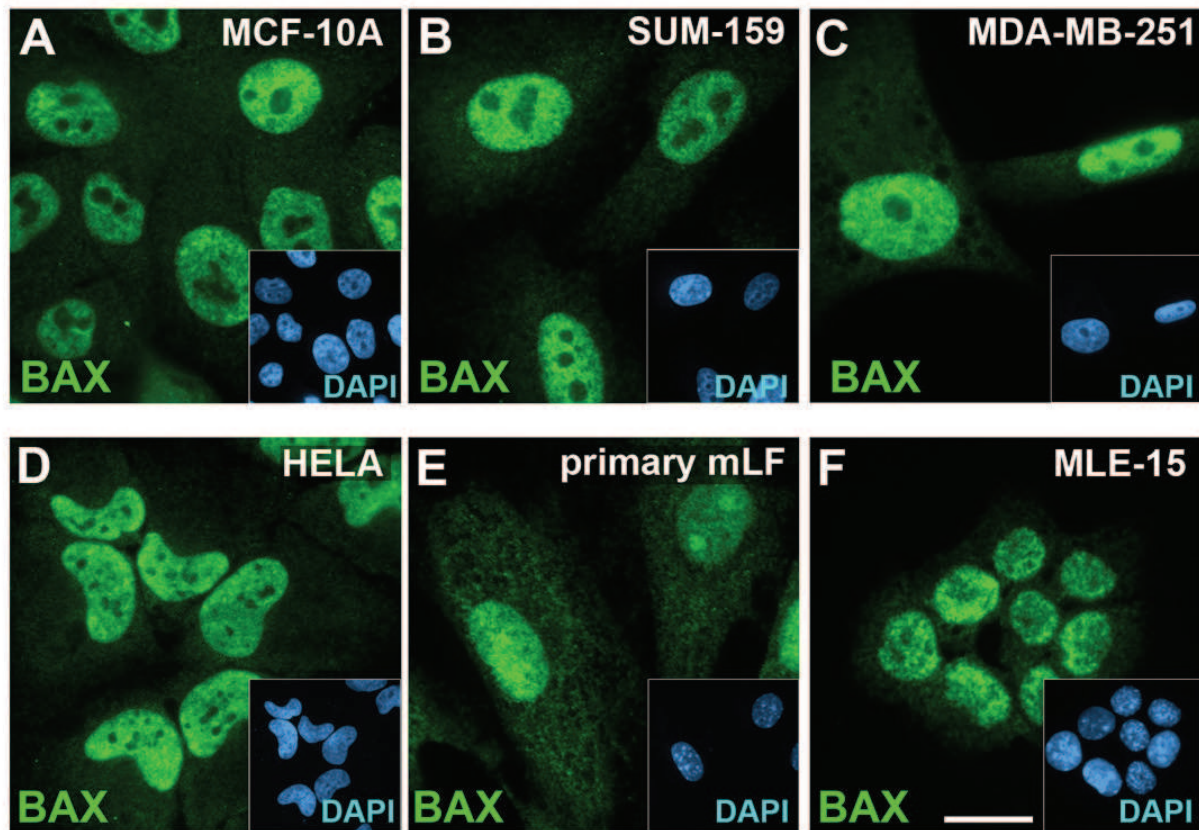


Figure 8 : BAX localization in fetal and adult lung tissues by immunohistochemistry.

(A-B) Immunohistochemistry showing BAX staining (red chromogen) in human fetal lung at 12 weeks of gestation. Higher magnification is showed in B. (C) BAX localization in normal alveolar (upper panel) and bronchiolar (lower panel) lung epithelium. (D-E) BAX staining in the epithelium of lung tumors: non-small cell lung carcinoma (NLCLC) such as adenocarcinoma; and small cell lung carcinoma (SCLC). (F) BAX staining in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), the insert in F shows BAX staining in the hyperplastic epithelium. (G) BAX staining within fibroblastic foci in IPF lung. (H) BAX staining within bronchiolised distal airspace in IPF lung. (I) Negative staining

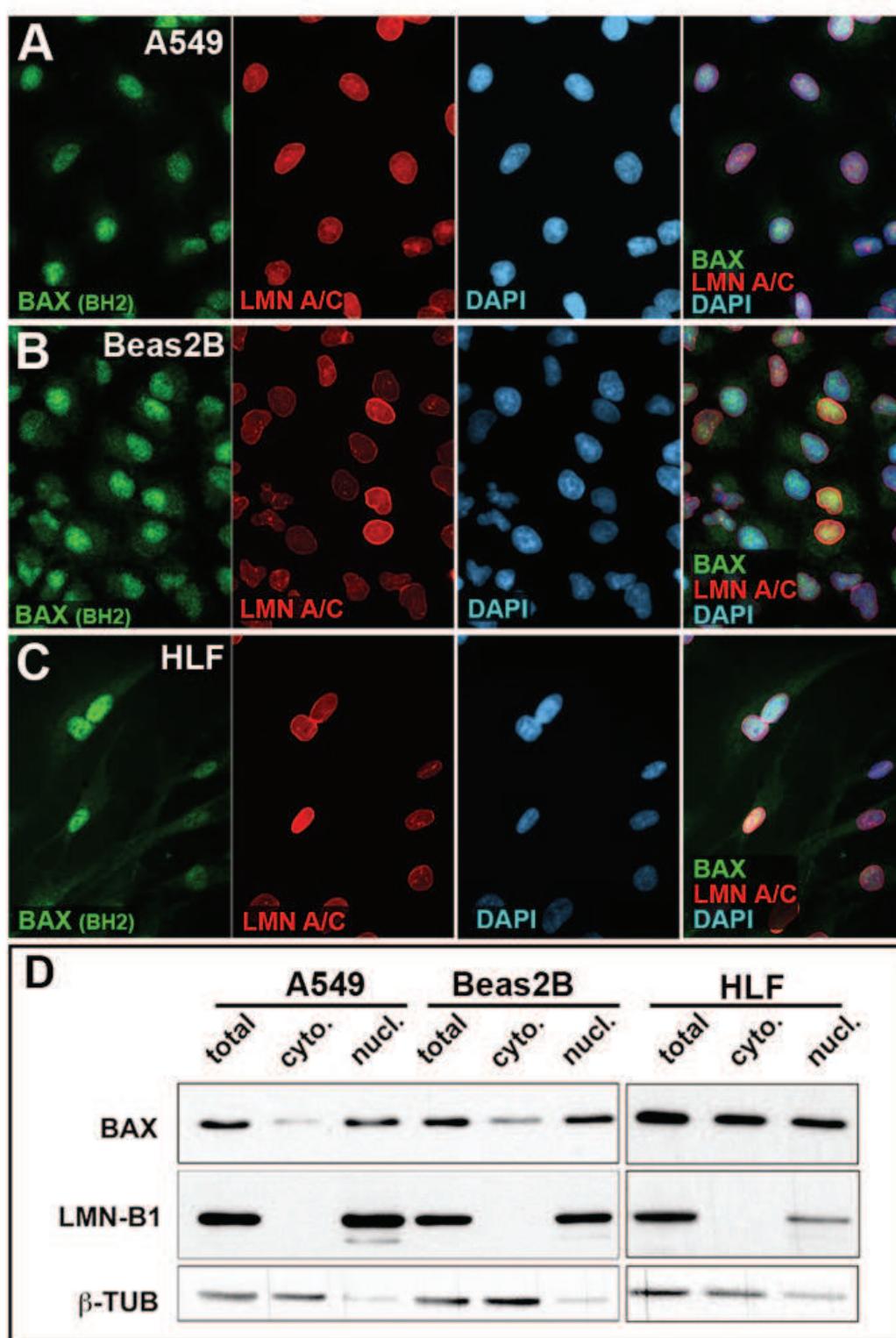
with control IgG. Nuclei are counterstained with hematoxylin. Scale bar: 20 μ m (B, G , H, I and lower panel in C), 10 μ m (inserts in B, C, E, F and G), 100 μ m (C, D, E), 80 μ m (A).

Supplemental Figures



Supplemental Figure S1: BAX is present in the interphasic nucleus of different cell types.

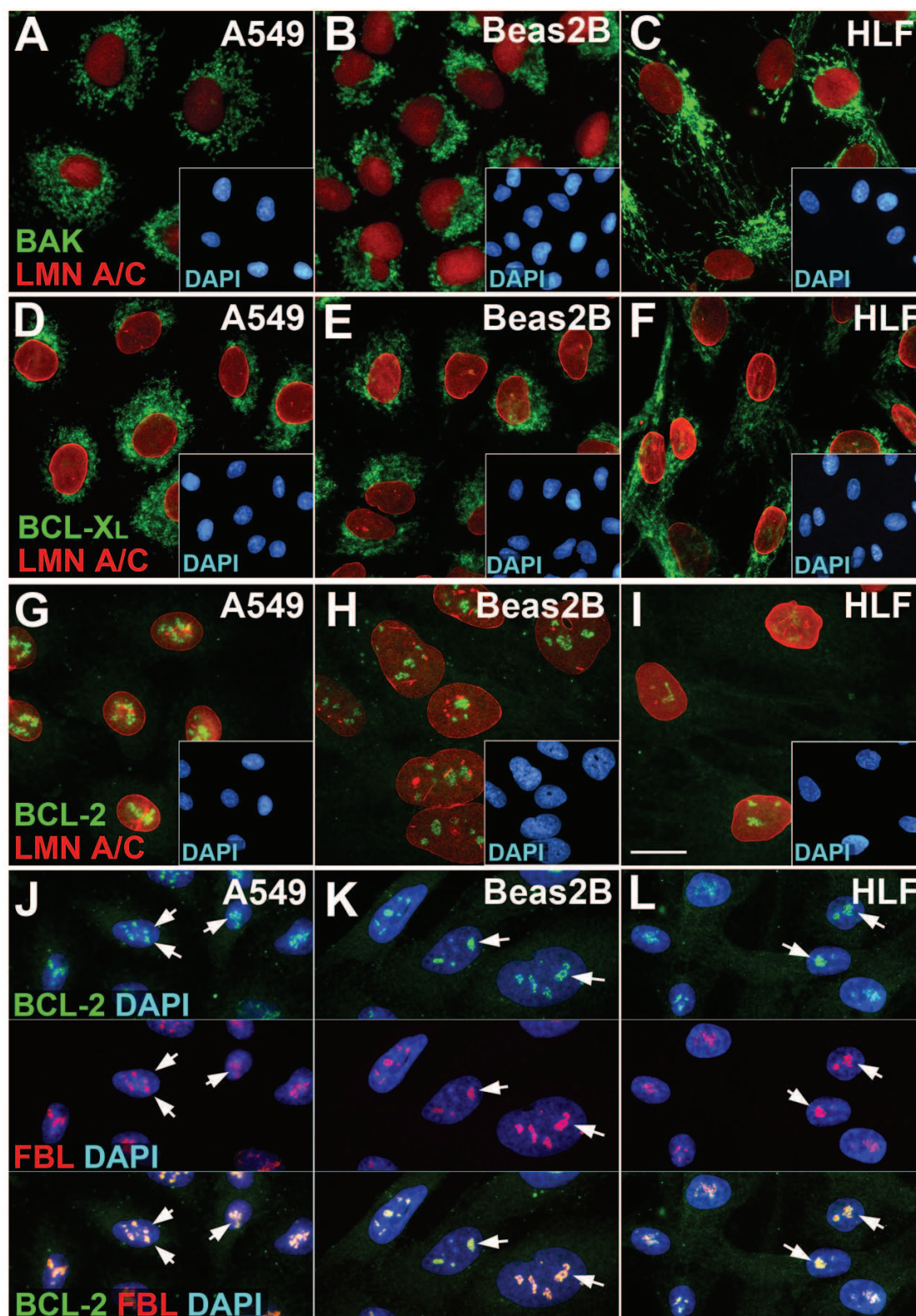
Immunofluorescence for BAX (green signal, 6A7 clone, after permeabilization with triton) in (A) immortalized Human mammary epithelial MCF-10A cells, (B) transformed Human mammary epithelial SUM-159 and (C) MDA-MB-231 cells, (D) transformed Human cervical epithelial Hela cells, (E) primary adult mouse lung fibroblasts mouse lung (mLF) and (F) alveolar mouse epithelial MLE-15 cells. The inserts display the corresponding DAPI staining. Note the BAX nuclear staining in all these cell types. –Scale bar: 10 μ m (A-F), 20 μ m (inserts in A-F).



Supplemental Figure S2: Bax is present in the interphasic nucleus of lung cell types.

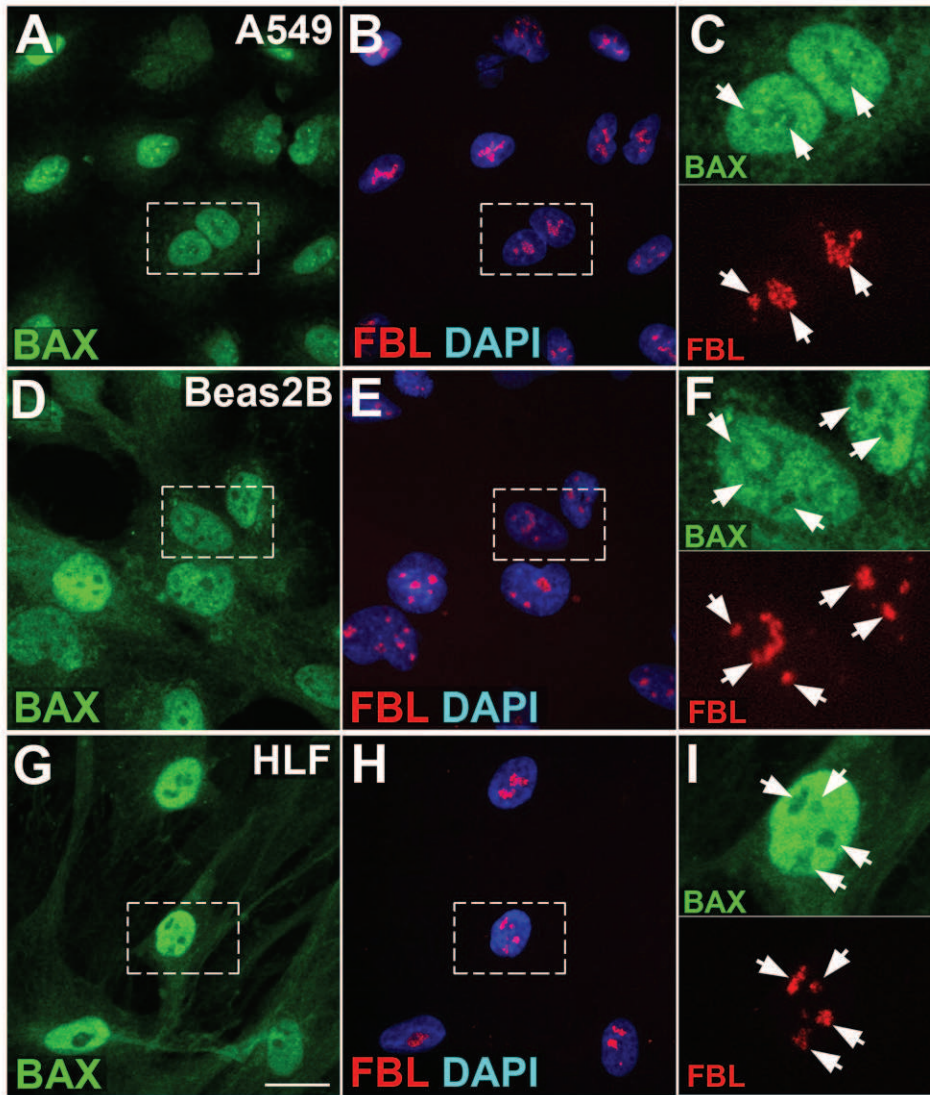
(A-C) Immunofluorescence for BAX with an antibody against an epitope next to the BH2 domain (green), Lamin A/C showing the nuclear envelop (red) and DAPI (blue) and merge in (A) A549, (B) Beas2B and (C) primary HLF. (D) Immunoblot after subcellular fractionation in different cell types showing BAX presence in cytoplasm (cyto) with β -Tubulin protein (TUB) and in the nuclear

fraction (nuc) with Lamin B1 (LMN-B1). Scale bar: 10 μ m.



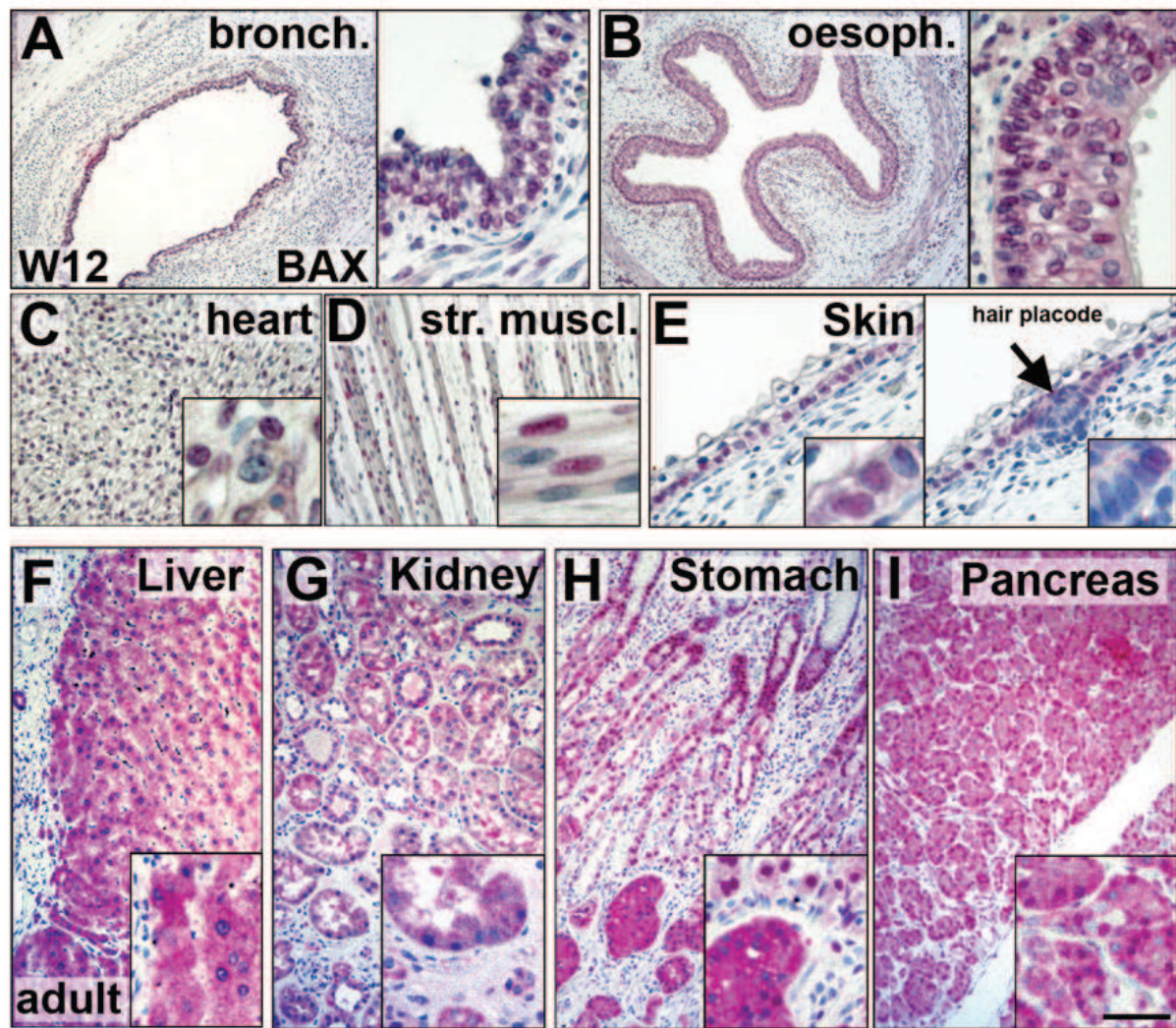
Supplemental Figure S3: cellular localization of BCL-XL, BAK and BCL-2 in interphasic A549, Beas2B and primary HLF.

(A-C) Immunofluorescence for BAK (in green) and Lamin AC (red) in A549 cells (A), Beas2B (B) and primary Human lung fibroblasts (C). The inserts showed corresponding nuclear staining with DAPI. Similar stainings were performed with BCL-XL (D-F) and BCL-2 (G-I). (J) Co-staining for BCL-2 and DAPI in A549 (upper panel), Fibrillarin (FBL) and DAPI (middle panel) and corresponding merge for BCL-2, FBL and DAPI in A549 cells. Similar stainings were performed in Beas2B (K) and primary HLF (L). Note that BAK and BCL-XL display a cytoplasmic localization in (A-C) and (D-F) while BCL-2 is restricted to the nucleoli within the nucleus (G-L), see white arrows in (J-L). Scale bar: 10 μ m (A-I), 20 μ m (inserts in A-I), 15 μ m (J-L).



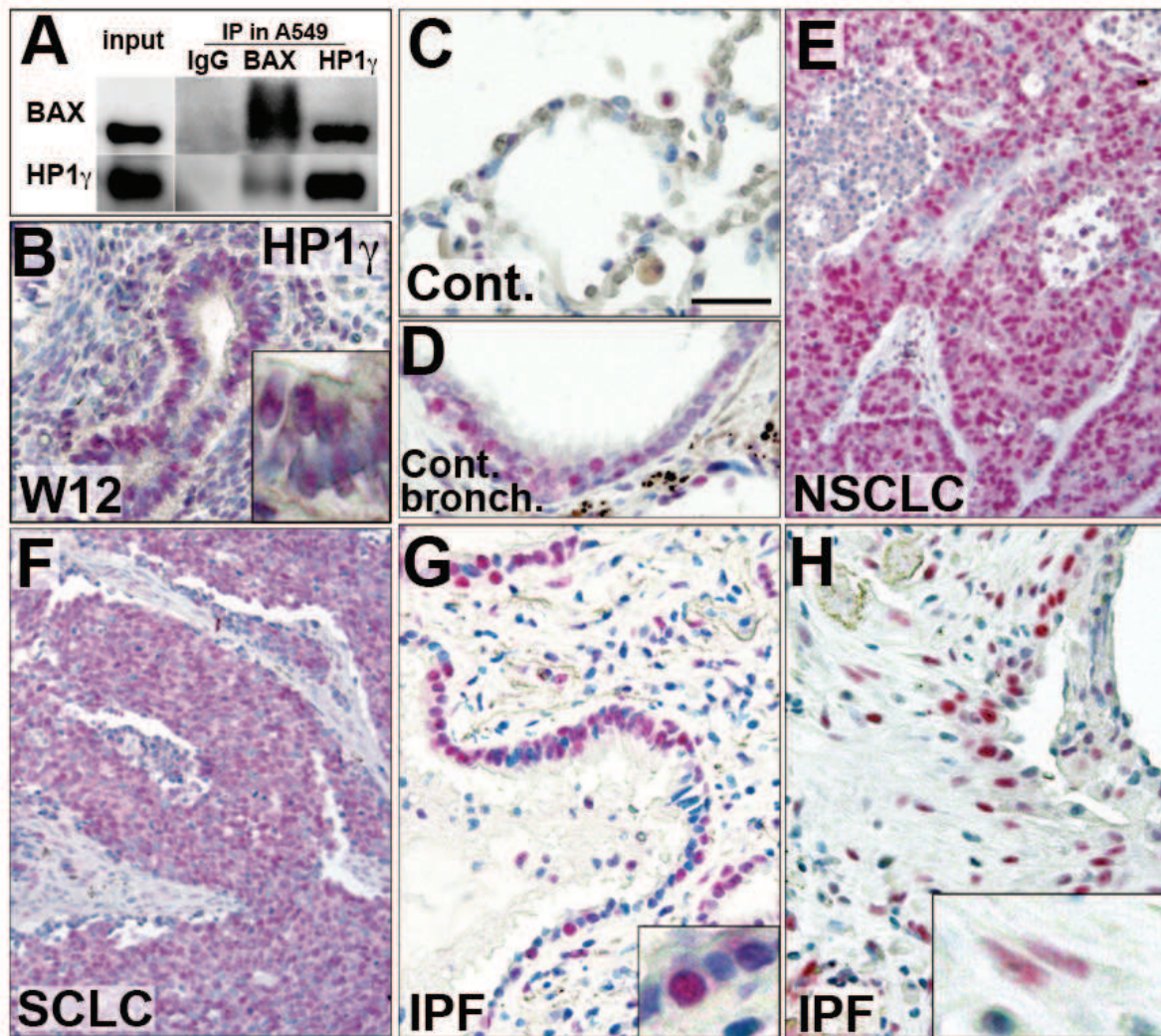
Supplemental Figure S4: Immunofluorescence for BAX and Fibrillarin in A549, Beas2B and primary HLF.

Immunofluorescence in A549 cells for (A) BAX (in green), (B) Fibrillarin (FBL in red, a nucleoli marker) and DAPI (blue). Panel (C) displays higher magnification of BAX (green, upper panel) and FBL (red, lower panel) corresponding to dashed boxes in A and B. Immunofluorescence in Beas2B cells for (D) BAX (in green), (E) Fibrillarin (red, a nucleoli marker) and DAPI (blue). Panel (F) displays higher magnification of BAX (green, upper panel) and FBL (red, lower panel) corresponding to dashed boxes in E and F. Immunofluorescence in primary Human lung fibroblasts (HLF) for (G) BAX (in green), (H) Fibrillarin (red, a nucleoli marker) and DAPI (blue). Panel (I) displays higher magnification of BAX (green, upper panel) and FBL (red, lower panel) corresponding to dashed boxes in G and H. Note that BAX staining is not enriched in the nucleoli (FBL positive area showed with white arrows) in C, F and I. Scale bar: 15 μ m (A, B, D, E, G, H), 5 μ m (C, F and I).



Supplemental Figure S5: Expression of BAX in normal fetal and adult tissues.

Immunohistochemistry showing BAX staining (red chromogen) in fetal tissues at 12 weeks of gestation (**A-E**) and adult normal tissues (**F-I**). The following fetal tissues are shown in (**A**) the bronchia, (**B**) the esophagus, (**C**) cardiac muscle, (**D**) striated muscle and (**E**) skin. The right panel in (**A-B**) display higher magnification of the corresponding left panel. The inserts in (**C-E**) display higher magnification. The right panel in (**E**) shows a developing hair follicle (black arrow). The following human adult normal tissues are shown in: (**F**) liver, (**G**) kidney, (**H**) stomach and (**I**) pancreas. The inserts show higher magnification of corresponding panel. Note that BAX nuclear staining was only observed in the gastric epithelium (**H**) and pancreatic parenchyma (**I**) compared to the liver and kidney tissues. Nuclei are counterstained with hematoxylin. Scale bar: 400 μm (left panels in **A, B**); 60 μm (right panel in **A, B** and inserts in **F-I**); 150 μm (**C, D, F-I**); 80 μm (**E**); 30 μm (inserts in **C-E**).



Supplemental Figure S6: Expression of HP1 γ in normal and pathological lungs.

(A) Immunoblot showing the interaction between BAX and HP1 γ after immunoprecipitation from chromatin cross-linked with DSP in A549 cells. (B-H) HP1 γ immunohistochemistry in (B) fetal lung at 12 weeks of gestational age, normal alveolar (C) and bronchiolar (D) epithelium, (E) lung adenocarcinoma (NSCLC), (F) small cell lung carcinoma (SCLC), (G) hyperplastic epithelium in IPF and (H) fibroblastic foci in IPF lung. Inserts show higher magnification of corresponding panel. Nuclei were counterstained with hematoxylin. Scale Bar: B, C, D, E, F, G, H: 100 μ m; inserts in B, G and H: 40 μ m.

DISCUSSION :

1) BAX nucléaire est présent dans les noyaux cellulaires de nombreux tissus embryonnaires, adultes normaux et pathologiques.

La localisation nucléaire de BAX avait été observée essentiellement in vitro dans des lignées cellulaires cancéreuses provenant de poumons humains (Nishita et al., 1998), (Hoetelmans et al., 2000), (Tripathi et al.), (Salah-eldin et al., 2000), et d'origine mammaire (Hoetelmans et al., 2000). Cependant, quelques études par immunohistochimie ont montré une localisation nucléaire de BAX dans les carcinomes épidermoïdes oraux humain (Bose et al.) et la pancréatite aiguë chez la souris (Gomez et al., 2001). Néanmoins, la présence de BAX dans le poumon normal ou pathologique n'avait pas été rapportée à notre connaissance.

a) BAX nucléaire dans les tissus sains

L'étude de l'expression de BAX par immunohistochimie montre une localisation nucléaire de BAX dans les cellules épithéliales et mésenchymateuses de poumons fœtaux humains en cours de ramification lors de la phase pseudoglandulaire. L'expression nucléaire de BAX n'était pas restreinte au poumon fœtal. La protéine BAX était aussi détectée dans le noyau des cellules d'autres tissus en développement (**figure 32**). Cette expression nucléaire de BAX dans différents organes et tissus en développement, suggère fortement une implication possible de cette forme nucléaire de BAX dans des fonctions cellulaires essentielles, mais qui reste à déterminer précisément dans des études futures.

De plus, nos analyses immunohistochimiques ont démontré une localisation hétérogène de BAX dans le noyau cellulaire dans d'autres organes. Le patron d'expression de BAX était cytoplasmique dans le foie et le rein (**figure 33A et 33B**). Par contre BAX était détectée dans le noyau et le cytoplasme de la muqueuse gastrique

(figure 33C), dans le pancréas (figure 33D) et la prostate (figure 33E). L'expression nucléaire de BAX semble donc dépendre de l'organe-tissu considéré.

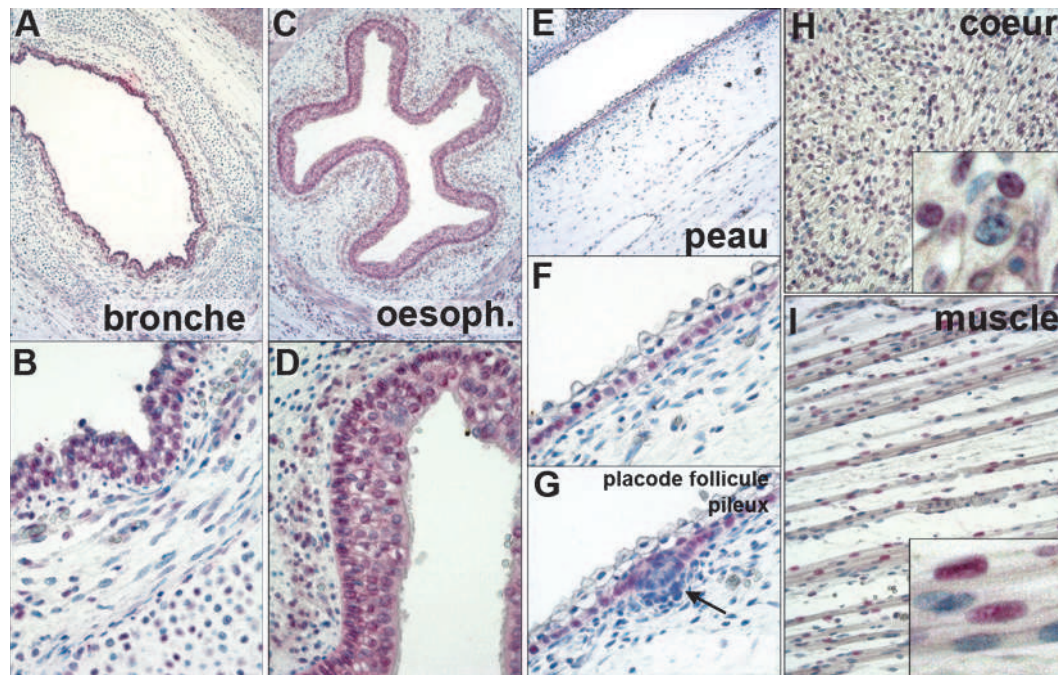


Figure 32: Immunomarcage pour BAX sur coupes d'embryon humain à 12 semaines de gestation dans (A-B) la bronche, (C-D) l'œsophage, la peau (E-G), le cœur (H) et le muscle strié (I).

Les noyaux sont contre-colorés en hématoxyline. Noter la localisation nucléaire de BAX dans les différents tissus. De manière intéressante, BAX n'est plus nucléaire dans les placodes épidermiques en cours de différenciation en follicule pileux.

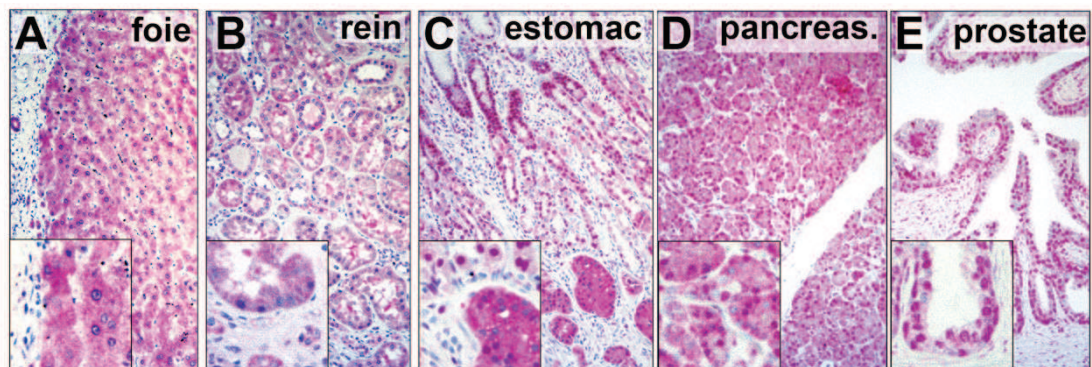


Figure 33 : Marquages immunohistochimiques de BAX dans les tissus humains sains. A: foie, B: rein, C: estomac, D: pancréas, E: prostate.

Les noyaux sont contre-colorés en hématoxyline.

Une étude précédente avait effectué des marquages immunohistochimiques de BAX sur des coupes de tissus sains humains, mais n'avait pas observé de marquage nucléaire de BAX dans différents organes dont le pancréas et les glandes gastriques

(Penault-Llorca et al., 1998). Ces auteurs ont observé seulement un marquage cytoplasmique et occasionnellement à la membrane nucléaire de BAX dans ces différents tissus humains en condition physiologique. Cette différence d'observation entre nos marquages et ceux de *Penault-Llorca et al.* peut s'expliquer par l'anticorps anti-BAX utilisé par cette équipe. En effet, pour ce marquage immunohistochimique les auteurs ont utilisé un seul anticorps anti-BAX, l'anticorps monoclonal 4F11. Ce même anticorps utilisé par *Hoetelmans et al.* en fluorescence sur des cellules de MCF-7 ne montraient qu'un marquage majoritairement cytoplasmique et un marquage nucléaire relativement faible de BAX en comparaison avec l'anticorps anti-BAX polyclonal 13666E qui montrait un fort marquage de BAX nucléaire dans ces mêmes cellules (Hoetelmans et al., 2000). Nos observations en immunohistochimie repose sur l'utilisation de deux anticorps différents dirigés contre BAX. Nous mettons donc en évidence pour la première fois par immunohistochimie l'expression nucléaire de BAX dans les tissus sains humains avec différents anticorps dirigés contre des domaines différents de la protéine BAX démontrant ainsi la spécificité du marquage. La présence de BAX dans le noyau des cellules de tissus sains pourrait suggérer que cette relocalisation de BAX dans le noyau soit impliquée aussi dans des fonctions d'homéostasie cellulaire chez l'adulte dont la nature reste encore à déterminer.

b) BAX nucléaire dans les tissus pathologiques

Nos études immunohistochimiques révèlent une localisation exclusivement cytoplasmique dans l'épithélium alvéolaire pulmonaire sains tandis que BAX est à la fois cytoplasmique et majoritairement nucléaire dans l'épithélium hyperplasique et les fibroblastes des foyers de fibroses dans les poumons provenant de patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique. Ces résultats suggèrent fortement une implication possible de la forme nucléaire de BAX dans la fibrogénèse pulmonaire. Comme mentionné dans l'introduction, la fibrose pulmonaire idiopathique est caractérisée par une accumulation de protéines de la matrice extracellulaire et de fibroblastes activés (myofibroblastes) dans les espaces aériens distaux, ainsi que d'un remodelage de l'épithélium alvéolaire qui mène à la désorganisation et à la destruction des alvéoles (Fernandez and Eickelberg, 2012). Les foyers de fibroblastes sont un trait caractéristique de la FPI (King et al., 2011). De plus, ces fibroblastes présentent une

résistance accrue à l'apoptose qui contribuerait à la persistance anormale des fibroblastes activés dans la FPI. Face à la présence de BAX dans le noyau de fibroblastes au sein des foyers de fibrose, nous avons émis l'hypothèse que la forme nucléaire de BAX pourrait être impliquée dans des fonctions non-apoptotiques qui favoriseraient leur accumulation dans le poumon fibrotique.

De plus, l'étude immunohistochimique de la localisation de BAX révèle aussi une localisation nucléaire de la protéine BAX dans les adénocarcinomes pulmonaires et les carcinomes pulmonaires à petites cellules. Les cellules épithéliales hyperplasiques dans la FPI, ainsi que les tumeurs pulmonaires épithéliales sont des structures en prolifération suggérant un rôle possible de la forme nucléaire de BAX dans le contrôle du cycle cellulaire (Strasser et al.), (Fernandez and Eickelberg, 2012), (King et al., 2011). De manière intéressante, nous avons aussi identifié une localisation nucléaire de BAX dans les macrophages alvéolaires provenant de tissu pulmonaire sain. Les macrophages alvéolaires ont été identifiés comme des cellules capables de proliférer (Landsman and Jung, 2007).

Cette étude immunohistochimique a permis d'identifier une expression de BAX nucléaire hétérogène et spécifique dans les tissus sains et dans des conditions pathologiques. Ensemble, ces données suggèrent fortement l'implication de la forme nucléaire de BAX dans des fonctions cellulaires autres qu'apoptotiques.

2) Localisation nucléaire de BAX dans les cellules en culture in vitro

Nos études en immunofluorescence et fractionnement cellulaire ont permis d'identifier in vitro une localisation cytosolique et majoritairement nucléaire de BAX dans les cellules épithéliales alvéolaires (A549) et bronchiques (Beas2B) humaines, ainsi que dans les fibroblastes issus de culture primaire de poumons témoins dans des conditions non-apoptotiques (**Figure 34 Control HLF**). De la même manière, par immunofluorescence, nous observons une expression cytoplasmique et majoritairement nucléaire de BAX dans les fibroblastes humains de culture primaire provenant de patients atteints de FPI (**Figure 34 IPF HLF**).

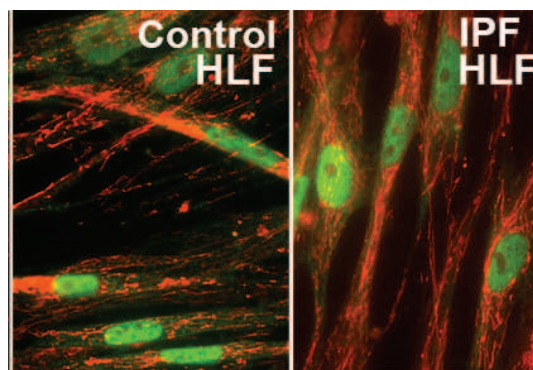


Figure 34 : Marquage nucléaire de BAX dans les fibroblastes de FPI.

Les fibroblastes primaires humains de patients témoins (Control HLF) et de patients atteints de FPI (IPF HLF) sont incubés avec un anticorps anti-BAX en vert et de la mitochondrie par le Mitotracker red en rouge et sont analysés par immunofluorescence.

Cependant, les mécanismes moléculaires permettant la relocalisation de BAX dans le noyau ainsi que sa fonction n'ont pas été étudiés. Les mécanismes qui régulent cette localisation nucléaire de BAX dans les cellules viables requièrent donc des études plus poussées. En effet, BAX ne possède pas de séquence de localisation nucléaire (NLS), ni de séquence d'export nucléaire (NES) comme la majorité des protéines de la famille BCL2, à l'exception du membre pro-apoptotique BOK et du membre anti-apoptotique A1/BFL-1. Comme mentionné dans l'introduction, le membre pro-apoptotiques BOK humain possède une séquence riche en leucine indiquant un signal d'export nucléaire dans son domaine BH3 (Bartholomeusz et al., 2006). La protéine A1 quant à elle, peut se relocaliser dans le noyau des cellules grâce à une séquence NLS (Somogyi et al., 2001). Cependant, il est possible que la protéine BAX (21kDa) diffuse passivement à travers les pores nucléaires comme les autres petites protéines qui traversent librement l'enveloppe nucléaire à travers les complexes de pores nucléaires (Sorokin et al., 2007). Les protéines BAX seraient ensuite retenues dans le noyau par ces interactions avec ces partenaires nucléaires.

a) BAX est à proximité de la chromatine : rôle dans la transcription ?

L'étude de la localisation sous-cellulaire de BAX par immunofluorescence identifie la protéine BAX au niveau de la matrice nucléaire dans les cellules A549 et les fibroblastes témoins. Par une approche par PLA (« proximity ligation assay »), nous observons que BAX se situe à proximité des marqueurs histones enrichies au niveau des

promoteurs activement transcrits comme les formes acétylées des protéines d'histone et l'histone H3 triméthylée en lysine 4 (H3K4me3) (Kimura).

Tableau 2 : Résumés des interactions de BAX avec différentes protéines nucléaires.
Les + indiquent l'intensité du signal et neg. (négatif), l'absence de signal par PLA.

Euchromatine		Eu/Hétérochromatine		Facteurs nucléaires	
acH3	++	HP1 γ	+++	TBP	neg.
		3mK9H3	++		
acH4	+++	3mK27H3	neg.	P53	neg.
		2mK9K3	neg.		
acH2B	+			KU70	neg.
3mK4H3	+++	Nucléomatrice			
3mK36H3	neg.	Lamin A/C	+++		

De manière frappante, BAX n'est pas associé avec l'histone H3 triméthylée en lysine 36 (H3K36me3) qui est enrichie dans le corps des gènes en cours de transcription (Kimura), ainsi qu'avec les marqueurs d'histone enrichis dans les zones de répression génique de l'hétérochromatine comme l'histone H3 triméthylée en lysine 27 (H3K27me3) et diméthylée en lysine 9 (H3K9me2) (Kimura). Le **tableau 2** ci-dessus résume l'ensemble des résultats obtenus par approche en PLA. Nos résultats suggèrent pour la première fois à notre connaissance que BAX se trouve à proximité de l'euchromatine, au niveau des régions promotrices de gènes activement transcrits dans les cellules épithéliales et les fibroblastes pulmonaires témoins.

De plus, nous montrons pour la première fois que BAX interagit avec l'hétérochromatine protéine 1 gamma (HP1 γ) dans les cellules A549 et les fibroblastes témoins. Nous avons confirmé l'interaction BAX/ HP1 γ dans les fibroblastes de FPI par PLA (**figure 32**). HP1 γ est une protéine tout d'abord connue comme principalement associée à des domaines d'hétérochromatine et de répression de gènes. Cependant HP1 γ a été récemment impliquée dans la régulation de l'activation des promoteurs de gènes dans les régions d'euchromatine (Kimura). Nous avons confirmé l'interaction

potentielle de BAX avec HP1 γ dans le noyau des fibroblastes de FPI par PLA (**figure 35**).

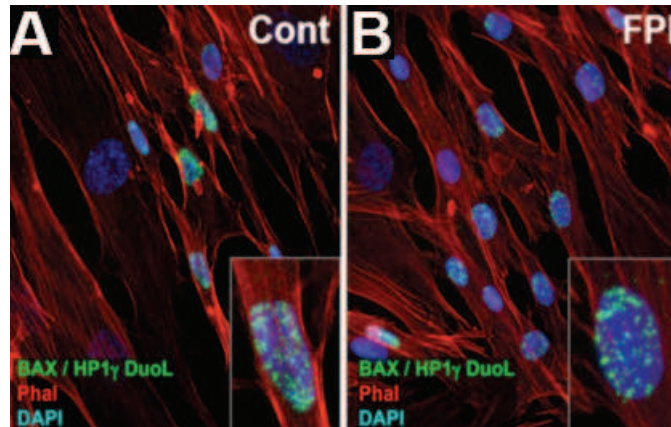


Figure 35: Interaction BAX/HP1 γ dans les fibroblastes témoins et de FPI.

Analyse des interactions entre BAX et HP1 γ par Immunofluorescences dans un test de proximity ligation assay (PLA). Les fibroblastes humains témoins (A, Cont) et de FPI (B, FPI) sont marqués avec des anticorps anti-BAX BD lapin et des anticorps anti-HP1 γ souris. Le signal est détecté par un kit Duolink II, les filaments d'actine sont marqués avec un anticorps anti-phalloïdine (rouge) et les noyaux sont marqués avec le DAPI (bleu). Chaque point vert représente la détection d'un complexe d'interaction protéine-protéine.

De plus, nous avons aussi observé que l'expression d'HP1 γ était associée à la localisation nucléaire de BAX dans les coupes de poumons de FPI. Ainsi BAX nucléaire pourrait participer activement à la transcription de gènes via son interaction avec HP1 γ participant peut être à la régulation du phénotype pro-fibrosant des fibroblastes et à l'hyperprolifération des cellules épithéliales hyperplasiques dans la fibrose pulmonaire. Des études complémentaires du complexe nucléaire BAX et des gènes cibles de ce complexe seront nécessaires pour tester cette hypothèse.

b) D'autres membres de la famille BCL-2 sont présents dans le noyau

Une autre conséquence de la rétention nucléaire de BAX serait de garder la protéine BAX loin du cytoplasme où elle pourrait induire sa fonction apoptotique par relocalisation du cytosol vers la membrane externe de la mitochondrie. Ce mécanisme a été récemment décrit pour la protéine BH3-only BIM. Au cours de l'infection virale de cellules endothéliales immortalisées par l'herpès virus de type 8 (HHV-8), la protéine virale vIRF1 (viral interferon regulatory factors1) interagit avec BIM puis séquestre BIM dans le noyau de l'hôte pour contrecarrer les signaux pro-apoptotiques induits par l'infection (Choi and Nicholas).

D'autres protéines pro- et anti-apoptotiques membres de la famille Bcl-2 comme BOK, BCL-2 et MCL-1 sont également présentes dans le noyau des cellules viables. Comme mentionné plus haut, il a été montré que BOK via sa séquence NES peut interagir avec CRM1, la protéine Exportin1 nucléaire (récepteur d'export pour les protéines contenant des signaux d'export nucléaire riche en leucine (NES)). BOK a été détectée à la fois dans le noyau et le cytoplasme des cellules 293T HEK, des cellules HeLa et des cellules de cancer du sein. L'accumulation de BOK au niveau nucléaire entraîne l'apoptose des cellules, suggérant un autre mécanisme d'induction de l'apoptose indépendant de la mitochondrie (Bartholomeusz et al., 2006).

De plus, la forme nucléaire de BCL-2, mais pas BAX nucléaire, interagit avec la protéine nucléaire PML (Promyelocytic leukemia protein) dans les cellules MCF-7 (Hoetelmans, 2004). De plus, BCL-2 interagit et stabilise le facteur de transcription HIF-1 α dans les noyaux des cellules de mélanome en hypoxie. BCL-2 nucléaire peut former un tri-complexe avec HIF-1 α et la protéine chaperonne HSP90 qui protège HIF-1 α de la dégradation par le protéasome dans ces cellules. Cette étude montre un rôle pro-angiogénique de Bcl-2 nucléaire dans les cellules de mélanome (Triscioglio et al.). De plus, BCL-2 peut interférer avec les systèmes de réparation de l'ADN conduisant à l'instabilité du génome dans les cellules surexprimant Bcl-2 (Laulier and Lopez). Une autre protéine anti-apoptotique de la famille Bcl-2, MCL-1 a été observée dans le noyau où elle interagit avec PCNA (proliferating cell nuclear antigen), un cofacteur de la polymérase delta de l'ADN dans les cellules HeLa.

Ainsi, plusieurs membres pro- et anti-apoptotiques de la famille BCL-2 (BAX, BOK, BIM, BCL-2, BFL-1S et MCL-1) peuvent être présent dans le noyau des cellules non-apoptotiques. Il reste à découvrir si les complexes d'interactions qui régulent leurs fonctions apoptotiques dans le cytoplasme (Chipuk and Green, 2008) peuvent avoir lieu dans le noyau pour orchestrer diverses fonctions cellulaires non-apoptotiques au cours de la fibrogénèse pulmonaire.

3) Les fonctions non-apoptotiques de BAX : implication dans la fibrogenèse pulmonaire ?

La réparation alvéolaire normale après une agression met en jeu les interactions épithélium-fibroblastes. Les études actuelles suggèrent que suite à une agression répétée

de l'épithélium, une anomalie des interactions épithélium-fibroblastes conduirait à une apoptose accrue des cellules épithéliales alvéolaires, une régénération anormale des cellules épithéliales alvéolaires (hyperprolifération des cellules épithéliales hyperplasiques) et à une accumulation des fibroblastes résistant à l'apoptose dans les foyers fibroblastiques (Fernandez and Eickelberg, 2012).

a) Rôle de BAX dans la prolifération cellulaire

Prolifération des cellules A549 et des fibroblastes témoins

Dans cette étude, l'inhibition de BAX diminue la prolifération des cellules épithéliales alvéolaires A549 et des fibroblastes primaires pulmonaires humains témoins. De plus, l'inhibition de BAX diminue la formation de colonies des cellules A549 dans un test de formation de colonies. Ce résultat peut paraître assez surprenant, car on s'attend à une meilleure survie des cellules en l'absence de la protéine BAX pro-apoptotique. Cependant, il a déjà été montré que la perte de la fonction de BAX pouvait être compensée par BAK, l'autre gardien de la voie apoptotique intrinsèque (Chipuk and Green, 2008). Par conséquent, ce résultat suggère également que les fonctions non-apoptotiques de BAX sont plus essentielles que sa fonction apoptotique pour la survie cellulaire dans cette étude.

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction de la thèse, il devient évident que les protéines de la famille Bcl-2 sont impliquées dans un large éventail de fonctions cellulaires essentielles telles que la régulation du cycle cellulaire (Janumyan et al., 2008), la dynamique mitochondriale (Boohaker et al., 2011), la bioénergétique (Galluzzi et al.), ainsi que la migration des cellules (Koehler et al., 2013). En ce qui concerne la fonction de BAX dans la prolifération cellulaire, une étude publiée en 1996 a montré que le taux de prolifération des cellules T matures surexprimant BAX en réponse à l'interleukine-2 était augmentée par rapport aux contrôles par une diminution du niveau d'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{Kip1} (Brady et al., 1996). Plus récemment, Janumyan et al. ont montré que la progression du cycle cellulaire était affectée dans les double KO MEFs *Bax*^{-/-} *Bak*^{-/-} par une augmentation de l'expression de P27^{Kip1} total et de P27^{Kip1} phosphorylée en Sérine 10 (Janumyan et al., 2008). Cependant, aucune de ces études n'a exploré l'implication éventuelle de la forme nucléaire de BAX dans ce processus.

Dans notre étude, nous avons observé une augmentation similaire de l'expression de P27^{Kip1} phosphorylée (ser10) dans les cellules A549 et les fibroblastes témoins utilisant seulement des ARNi *BAX*. Le niveau d'expression de BAK n'est pas perturbé dans les cellules traitées avec les ARNi *BAX* par rapport aux ARNi contrôles (données non montrées). De plus, nous avons montré que BAX contrôle aussi l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire P21 dans les cellules A549 et les fibroblastes pulmonaires témoins. De manière intéressante, les mécanismes moléculaires contrôlant l'expression de P21 dans les cellules A549 et les fibroblastes pulmonaires humains primaires semblent différents. En effet, l'augmentation de P21 corrèle avec une augmentation du niveau de la protéine P53 dans les cellules A549 traitées avec les ARNi *BAX*, tandis que l'expression de P53 reste inchangée dans les fibroblastes pulmonaires humains primaires. Le facteur de transcription P53 est bien connu pour contrôler le niveau d'expression de P21 dans plusieurs types cellulaires (He et al., 2005).

Prolifération des fibroblastes de FPI

De la même manière que dans les fibroblastes pulmonaires humains primaires provenant de patients témoins, nous observons qu'une diminution du niveau de l'expression de la protéine BAX totale avec l'ARNi *BAX* (**Figure 36A**) corrèle avec une diminution de la prolifération cellulaire des fibroblastes pulmonaires humains primaires provenant de patients atteints de FPI (**figure 36B**). Nous observons une diminution d'environ 25% (n=4) de la prolifération cellulaire des fibroblastes de FPI transfectés avec les ARNi *BAX* comparées aux contrôles transfectés avec les ARNi *contrôle*. Nous n'avons pas non plus observé d'effet cytotoxique dans cette expérience (données non montrées).

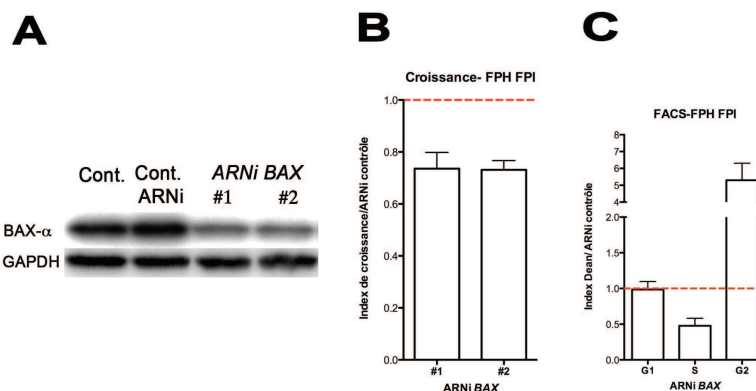


Figure 36 : La prolifération et le cycle cellulaire des FPH de FPI est inhibée dans les cellules transfectées avec les ARNi BAX A.

Les FPH de FPI sont transfectés soit avec les ARNi contrôles soit avec les ARNi *BAX* #1 et #2 pendant 48h à 50nM. B. On regarde l'index de prolifération des cellules transfectées avec les ARNi *BAX* #1 et #2 par rapport aux cellules transfectées avec les ARNi contrôles (ligne rouge) C. Après les 48h de transfection, les cellules sont fixées à l'éthanol 70% et analysées par FACS après marquage à l'iodure de propidium.

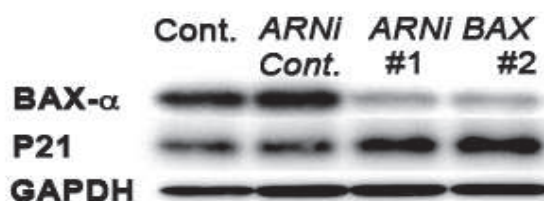


Figure 37 : L'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire P21 augmente dans les FPH de FPI transfectées avec les ARNi BAX.

Les FPH de FPI sont transfectés soit sans aucun ARN, soit avec les ARNi contrôles ou soit avec les ARNi *BAX* #1 et #2 à 50nM. On regarde l'expression de P21 et P53 par immunoblot après 48H de transfection avec les ARNi *BAX* #1 et #2.

Ces résultats suggèrent que de la même manière que pour les fibroblastes témoins, BAX est impliqué dans la prolifération des fibroblastes de FPI. Afin, de mieux caractériser cette diminution de la prolifération cellulaire en présence d'*ARNi BAX*, nous avons mesuré par FACS le contenu en ADN cellulaire par marquage à l'iodure de propidium des fibroblastes de FPI (**Figure 36C**). Nous observons une diminution des cellules en phase S transfectées avec les ARNi *BAX*. Par contre, de manière intéressante nous observons une augmentation en phase G2M des cellules pour les fibroblastes de FPI et non en phase G1 comme pour les fibroblastes témoins transfectés avec les ARNi *BAX* (**Figure 36C**). L'étude de l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire P21 montre les mêmes résultats que dans les fibroblastes témoins (**Figure 37**). Des études complémentaires sur l'expression de P27^{Kip1} phosphorylée (ser10) seront menées

prochainement afin d'identifier l'implication éventuelle de cet inhibiteur du cycle cellulaire sur les différences de phases d'arrêt du cycle cellulaire entre les fibroblastes témoins et de FPI.

b) Implication de la forme nucléaire de BAX dans le contrôle du cycle cellulaire

Une construction de BAX ciblant le noyau entraîne le phénotype opposé de l'inhibition de BAX par les ARNi sur la prolifération des cellules A549 et les fibroblastes témoins. Ces résultats suggèrent fortement que la forme nucléaire de BAX pourrait influencer directement la progression du cycle cellulaire. En perspective, cette étude de la surexpression des formes de BAX ciblant le cytoplasme ou ciblant le noyau devra être reproduite dans les fibroblastes de FPI.

De manière intéressante, plusieurs protéines membres de la famille BCL-2 sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire tels que BCL-2 (Hoetelmans et al., 2000) et MCL-1 (Fujise et al., 2000), (Jamil et al., 2005) étant également présentes dans les noyaux des cellules. En particulier, la forme nucléaire de MCL-1 inhibe la progression du cycle cellulaire à travers son interaction avec PCNA (Fujise et al., 2000). Un variant court de MCL-1 a également été observé dans le noyau des cellules myéloïdes murines interagissant avec la protéine kinase régulatrice du cycle cellulaire Cdk1. Le variant court de MCL-1 nucléaire inhibe la progression du cycle cellulaire entre les phases G2 et M via des interactions avec Cdk1, empêchant sûrement ce dernier de se lier à son partenaire conventionnel la cycline B1 (Jamil et al., 2005). Des études approfondies seront nécessaires pour découvrir si les interactions nucléaires entre BAX et les autres membres de la famille Bcl-2 sont nécessaires pour la progression du cycle cellulaire dans les cellules de poumons sains ou de fibrose.

Dans cette étude, nous avons montré que la diminution du niveau de la protéine BAX totale par ARNi était suffisante pour avoir un impact sur la prolifération cellulaire des cellules épithéliales A549 et des fibroblastes primaires pulmonaires humains en régulant l'expression des kinases inhibitrices dépendantes des cyclines P21 et P27. Nos résultats sur le rôle de BAX nucléaire dans la prolifération cellulaire *in vitro*, suggèrent que BAX nucléaire pourrait être impliquée dans la croissance des cellules épithéliales hyperprolifératives observée dans ces maladies.

c) Rôle de BAX dans la différenciation myofibroblastique

Dans un microenvironnement approprié, les fibroblastes peuvent se différencier et acquérir des caractéristiques des cellules musculaires lisses. Ces fibroblastes différenciés nommés myofibroblastes sont présents dans les tissus normaux et sont essentiels dans la réparation des tissus (Duffield et al.). Les myofibroblastes sont des producteurs actifs de cytokines et de collagène. Le facteur de croissance TGF- β 1 est un inducteur majeur de la différenciation myofibroblastique et est sécrété par les fibroblastes.

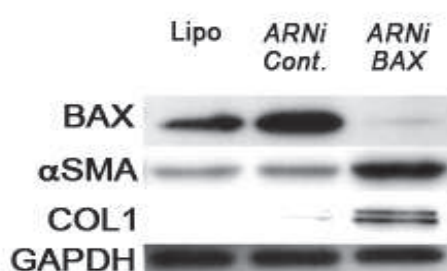


Figure 38: Augmentation de l'αSMA et du collagène I (COL1) dans les fibroblastes de FPI transfectés avec les ARNi BAX (n=4).

Les fibroblastes de FPI sont transfectés soit avec le réactif de transfection seul (Lipo), soit avec l'ARNi contrôle (ARNi Cont.) ou soit avec l'ARNi BAX qui contient les ARNi #1 et #2 mélangés à 50nM pendant 72H. L'expression des marqueurs de différenciation est analysée par immunoblot.

L'étude des marqueurs de différenciation myofibroblastiques dans les fibroblastes de FPI transfectés avec les ARNi BAX montrent les mêmes résultats qu'avec les fibroblastes témoins. Les fibroblastes transfectés avec les ARNi BAX montrent une augmentation de l'expression au niveau protéique de l'α-SMA et du collagène I par rapport aux contrôles (**Figure 38**).

De plus, nous observons que l'inhibition de BAX corrèle avec une augmentation de l'expression de l'ARNm *TGFβ*1 dans les fibroblastes témoins et de FPI. De manière intéressante, plusieurs études ont montré que TGF- β 1 régule positivement l'expression de l'expression du gène *P21* (Pardali et al., 2000).

Dans l'étude précédente sur l'effet de l'inhibition de BAX et de la surexpression de BAX nucléaire dans la prolifération cellulaire nous avons mis en évidence que la forme nucléaire de BAX régulait l'expression de P21 dans les

fibroblastes pulmonaires témoins. Ce résultat peut être corrélé avec une étude *in vitro* qui a mis en évidence que la surexpression de P21 induisait la différenciation des fibroblastes cardiaques en myofibroblastes (Roy et al., 2007). Par conséquent, l'augmentation de l'expression des pro-fibrotiques TGF- β 1 et P21 que nous observons pourrait donc expliquer la régulation positive des marqueurs de différenciation myofibroblastiques dans les cellules transfectés avec les ARNi *BAX*.

Ces résultats suggèrent un rôle de *BAX* dans la régulation des marqueurs de différenciation myofibroblastique dans les fibroblastes témoins et de FPI. L'étude de la surexpression des formes cytoplasmiques et nucléaires de *BAX* met en évidence le rôle de la forme nucléaire de *BAX* dans la régulation de l'expression de l' α SMA. Ainsi *BAX* nucléaire semble impliqué dans la régulation des marqueurs de différenciation myofibroblastiques dans les fibroblastes pulmonaires. De la même manière que pour les fibroblastes témoins, il faudra étudier les effets de la surexpression des formes cytoplasmiques et nucléaires de *BAX* sur la différenciation myofibroblastique dans les fibroblastes de FPI.

En résumé, *BAX* aurait une action anti-fibrosante en maintenant les fibroblastes dans un état indifférencié. Cependant, la forme nucléaire *BAX* favoriserait la fibroprolifération du fait de son rôle dans le contrôle du cycle cellulaire. Cependant, nous n'avons pas observé de différence entre les fibroblastes témoins et de fibroses en ce qui concerne le rôle de *BAX* dans la prolifération et la différenciation myofibroblastique.

d) Implication de *BAX* dans la migration des fibroblastes pulmonaires en réponse au PDGF

La migration est un processus clé au cours de la réparation pulmonaire. Dans la fibrose pulmonaire, la migration des fibroblastes est induite par le PDGF sécrété par les macrophages pulmonaires activés (Ross et al., 1986). Nous avons donc étudié les effets de l'inhibition de *BAX* sur la migration des fibroblastes pulmonaires témoins (**Figure 39** FPH FPI) et de FPI (**Figure 39** FPH FPI). Le test de migration est basé sur un modèle de Chambre de Boyden modifiée et la protéine recombinante PDGF-BB, agent chimioattractant pro-fibrosant a été utilisée pour stimuler la migration des fibroblastes dans ce modèle.

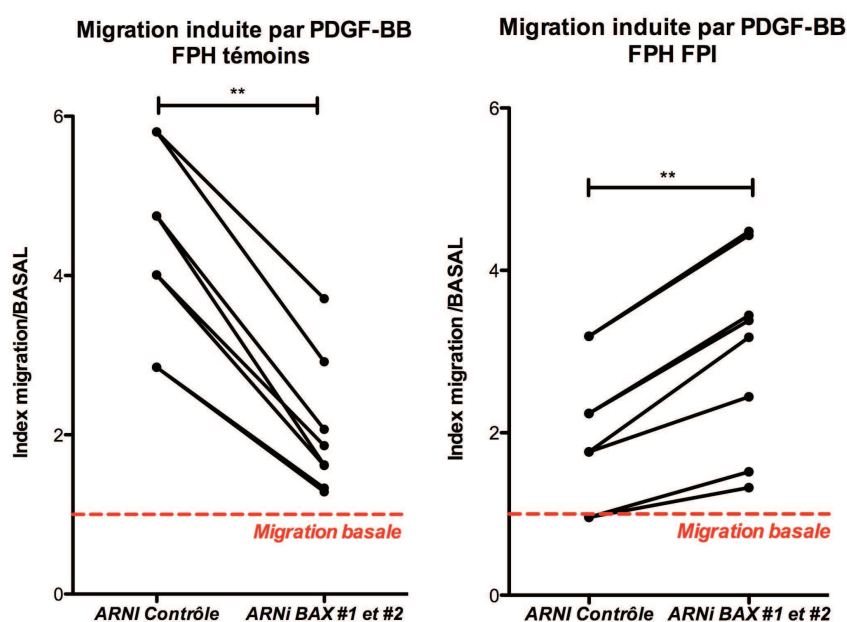


Figure 39 : Effets différentiels de l'inhibition de BAX sur la migration des FPH de témoins et de FPI.

Les FPH témoins et de FPI sont transfectés avec les ARNi BAX #1 et #2 pendant 48h à 50nM, puis déprivés en sérum et déposés dans une chambre de Boyden modifiée. La migration est stimulée par la protéine recombinante PDGF-BB un agent chimioattractant et pro-fibrosant. On regarde la migration des FPH en présence de PDGF-BB par rapport à la migration basale sans PDGF-BB (ligne rouge).

Dans cette étude, nous n'avons pas observé d'effets significatifs sur la migration basale entre les fibroblastes transfectés avec les ARNi BAX et les fibroblastes contrôles (données non montrées). Par contre nous observons un effet différentiel significatif entre la migration des fibroblastes témoins et ceux de FPI avec les ARNi BAX. En effet, l'inhibition de BAX diminue de façon significative d'environ 50% la migration des fibroblastes témoins alors qu'ils augmentent d'environ 50% la migration des fibroblastes de FPI sous stimulation au PDGF-BB.

Actuellement, nous ne pouvons pas expliquer la différence de migration entre les fibroblastes témoins et de FPI sous stimulation au PDGF-BB. Cet effet différentiel sur la migration des fibroblastes témoins et de FPI étant observée uniquement en présence de PDGF-BB, cela suggérerait l'implication de voie de signalisation du PDGF. Dans la FPI, les récepteurs PDGFR α et PDGFR β ont été impliqués dans la migration des fibroblastes pulmonaires humains (Bonner, 2004). Une étude a montré récemment, que la stimulation des fibroblastes pulmonaires par PDGF-BB entraînait une

augmentation majoritaire de la phosphorylation du récepteur PDGFR α et faiblement la phosphorylation du récepteur PDGFR β (Donovan et al.). De plus, il a été mis en évidence que le TGF- β 1 régule négativement le PDGFR α dans les fibroblastes pulmonaires humains (Bonner et al., 1995). Une dérégulation de l'expression ou de la phosphorylation du récepteur PDGFR α permettrait peut-être d'expliquer cet effet différentiel, via ou non une régulation du TGF- β 1. De plus, nous observons une migration moins importante des fibroblastes pulmonaires de FPI par rapport aux FPH de témoin en présence de PGDF-BB, ce qui corrèlerait avec un défaut de la voie de signalisation du PDGF dans les fibroblastes de FPI par rapport aux fibroblastes témoins.

Des études complémentaires sur la localisation de la protéine BAX en présence de PDGF-BB par fractionnement seront nécessaires pour montrer ou non des implications de la localisation de BAX dans cet effet différentiel de la migration entre les FPH de témoins et de FPI. Il est possible que l'expression de BAX dans les FPH de FPI joue un rôle pro-fibrosant en favorisant leur survie et en diminuant la migration de ces myofibroblastes, contribuant ainsi à leur accumulation dans les foyers fibroblastiques. Afin de démontrer ou non l'implication des formes cytoplasmiques ou nucléaires de la protéine BAX, l'étude de la surexpression des formes nucléaires et cytoplasmiques de BAX dans la migration des fibroblastes témoins et de FPI sur la migration doit être entreprise.

Ces résultats suggèrent une implication de BAX dans le processus de migration des fibroblastes pulmonaires. Ce processus jouerait un rôle prépondérant dans la progression de la pathogenèse de la FPI. La régulation de la migration cellulaire par des membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 a déjà été décrite. Cet effet a été tout d'abord été décrit pour le membre anti-apoptotique BCL-xL par *Yang et al.* (Yang et al.) puis pour les membres anti-apoptotiques BCL-2, BCL-xL et MCL-1 par *Koehler et al.* (Koehler et al., 2013) dans les cellules humaines de cancer colorectal. BCL-2, BCL-xL et MCL-1 favorisent la migration et l'invasion des cellules de cancers colorectales, indépendamment de leur rôle anti-apoptotique.

En conclusion, nous pensons que le niveau d'expression de BAX dans le poumon pathologique ne peut être considéré comme un simple marqueur de la balance

apoptotique car cela minimiserait la contribution des fonctions non-apoptotiques de Bax dans la progression de la fibrose pulmonaire.

Bibliographie

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., and Akey, C.W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9, 423-432.
- Adams, J.M., and Cory, S. (2007a). Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* 19, 488-496.
- Adams, J.M., and Cory, S. (2007b). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324-1337.
- Ahn, B.Y., Trinh, D.L., Zajchowski, L.D., Lee, B., Elwi, A.N., and Kim, S.W. (2010). Tid1 is a new regulator of p53 mitochondrial translocation and apoptosis in cancer. *Oncogene* 29, 1155-1166.
- Aitken, A., Baxter, H., Dubois, T., Clokie, S., Mackie, S., Mitchell, K., Peden, A., and Zemlickova, E. (2002). Specificity of 14-3-3 isoform dimer interactions and phosphorylation. *Biochem Soc Trans* 30, 351-360.
- Ajayi, I.O., Sisson, T.H., Higgins, P.D., Booth, A.J., Sagana, R.L., Huang, S.K., White, E.S., King, J.E., Moore, B.B., and Horowitz, J.C. (2013). X-linked inhibitor of apoptosis regulates lung fibroblast resistance to Fas-mediated apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 49, 86-95.
- Akiri, G., Cherian, M.M., Vijayakumar, S., Liu, G., Bafico, A., and Aaronson, S.A. (2009). Wnt pathway aberrations including autocrine Wnt activation occur at high frequency in human non-small-cell lung carcinoma. *Oncogene* 28, 2163-2172.
- Alavian, K.N., Li, H., Collis, L., Bonanni, L., Zeng, L., Sacchetti, S., Lazrove, E., Nabili, P., Flaherty, B., Graham, M., *et al.* (2011). Bcl-xL regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1FO ATP synthase. *Nat Cell Biol* 13, 1224-1233.
- Alimonti, J.B., Shi, L., Baijal, P.K., and Greenberg, A.H. (2001). Granzyme B induces BID-mediated cytochrome c release and mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 276, 6974-6982.
- Altieri, D.C. (2010). Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem J* 430, 199-205.
- Amara, N., Goven, D., Prost, F., Muloway, R., Crestani, B., and Boczkowski, J. (2010). NOX4/NADPH oxidase expression is increased in pulmonary fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates TGFbeta1-induced fibroblast differentiation into myofibroblasts. *Thorax* 65, 733-738.
- Amsel, A.D., Rathaus, M., Kronman, N., and Cohen, H.Y. (2008). Regulation of the proapoptotic factor Bax by Ku70-dependent deubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5117-5122.

- Annis, M.G., Soucie, E.L., Dlugosz, P.J., Cruz-Aguado, J.A., Penn, L.Z., Leber, B., and Andrews, D.W. (2005). Bax forms multispanning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *EMBO J* 24, 2096-2103.
- Apte, S.S., Mattei, M.G., and Olsen, B.R. (1995). Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX delta. *Genomics* 26, 592-594.
- Armanios, M.Y., Chen, J.J., Cogan, J.D., Alder, J.K., Ingersoll, R.G., Markin, C., Lawson, W.E., Xie, M., Vulto, I., Phillips, J.A., 3rd, *et al.* (2007). Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 356, 1317-1326.
- Atkinson, E.A., Barry, M., Darmon, A.J., Shostak, I., Turner, P.C., Moyer, R.W., and Bleackley, R.C. (1998). Cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide. Caspase 3 activation is primarily the result of the direct action of granzyme B. *J Biol Chem* 273, 21261-21266.
- Bajwa, N., Liao, C., and Nikolovska-Coleska, Z. (2012). Inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 22, 37-55.
- Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L., and Korsmeyer, S.J. (1985). Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41, 899-906.
- Bandyopadhyay, A., Tsuji, K., Cox, K., Harfe, B.D., Rosen, V., and Tabin, C.J. (2006). Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet* 2, e216.
- Barbas-Filho, J.V., Ferreira, M.A., Sesso, A., Kairalla, R.A., Carvalho, C.R., and Capelozzi, V.L. (2001). Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IFP)/usual interstitial pneumonia (UIP). *J Clin Pathol* 54, 132-138.
- Barry-Hamilton, V., Spangler, R., Marshall, D., McCauley, S., Rodriguez, H.M., Oyasu, M., Mikels, A., Vaysberg, M., Ghermazien, H., Wai, C., *et al.* (2010). Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat Med* 16, 1009-1017.
- Bartholomeusz, G., Wu, Y., Ali Seyed, M., Xia, W., Kwong, K.Y., Hortobagyi, G., and Hung, M.C. (2006). Nuclear translocation of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bok induces apoptosis. *Mol Carcinog* 45, 73-83.
- Baumgartner, K.B., Samet, J.M., Stidley, C.A., Colby, T.V., and Waldron, J.A. (1997). Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 155, 242-248.
- Bayir, H., and Kagan, V.E. (2008). Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory. *Crit Care* 12, 206.

- Beachy, P.A., Hymowitz, S.G., Lazarus, R.A., Leahy, D.J., and Siebold, C. (2010). Interactions between Hedgehog proteins and their binding partners come into view. *Genes Dev* 24, 2001-2012.
- Beeh, K.M., Beier, J., Haas, I.C., Kornmann, O., Micke, P., and Buhl, R. (2002). Glutathione deficiency of the lower respiratory tract in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 19, 1119-1123.
- Bellusci, S., Furuta, Y., Rush, M.G., Henderson, R., Winnier, G., and Hogan, B.L. (1997). Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development* 124, 53-63.
- Beroukhim, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J.S., Dobson, J., Urashima, M., *et al.* (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463, 899-905.
- Berridge, M.J. (2002). The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 32, 235-249.
- Biswas, S.C., and Greene, L.A. (2002). Nerve growth factor (NGF) down-regulates the Bcl-2 homology 3 (BH3) domain-only protein Bim and suppresses its proapoptotic activity by phosphorylation. *J Biol Chem* 277, 49511-49516.
- Blankenship, J.W., Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A.V., Kirkpatrick, D.S., Izrael-Tomasevic, A., Phu, L., Arnott, D., Aghajan, M., Zobel, K., *et al.* (2009). Ubiquitin binding modulates IAP antagonist-stimulated proteasomal degradation of c-IAP1 and c-IAP2(1). *Biochem J* 417, 149-160.
- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G., and Thompson, C.B. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608.
- Bolanos, A.L., Milla, C.M., Lira, J.C., Ramirez, R., Checa, M., Barrera, L., Garcia-Alvarez, J., Carbajal, V., Becerril, C., Gaxiola, M., *et al.* (2012). Role of Sonic Hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303, L978-990.
- Bonneau, B., Prudent, J., Popgeorgiev, N., and Gillet, G. (2013). Non-apoptotic roles of Bcl-2 family: the calcium connection. *Biochim Biophys Acta* 1833, 1755-1765.
- Bonner, J.C. (2004). Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 255-273.
- Bonner, J.C., Badgett, A., Lindroos, P.M., and Osornio-Vargas, A.R. (1995). Transforming growth factor beta 1 downregulates the platelet-derived growth factor alpha-receptor subtype on human lung fibroblasts in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13, 496-505.
- Boohaker, R.J., Zhang, G., Carlson, A.L., Nemec, K.N., and Khaled, A.R. (2011). BAX supports the mitochondrial network, promoting bioenergetics in nonapoptotic cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 300, C1466-1478.

Bose, P., Klimowicz, A.C., Kornaga, E., Petrillo, S.K., Matthews, T.W., Chandarana, S., Magliocco, A.M., Brockton, N.T., and Dort, J.C. Bax expression measured by AQUAnalysis is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 12, 332.

Bouillet, P., Cory, S., Zhang, L.C., Strasser, A., and Adams, J.M. (2001). Degenerative disorders caused by Bcl-2 deficiency prevented by loss of its BH3-only antagonist Bim. *Dev Cell* 1, 645-653.

Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D.C., Tarlinton, D.M., Kay, T.W., Kontgen, F., Adams, J.M., and Strasser, A. (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286, 1735-1738.

Bouillet, P., Purton, J.F., Godfrey, D.I., Zhang, L.C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J.M., and Strasser, A. (2002). BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 415, 922-926.

Boulares, A.H., Yakovlev, A.G., Ivanova, V., Stoica, B.A., Wang, G., Iyer, S., and Smulson, M. (1999). Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem* 274, 22932-22940.

Boyd, J.M., Gallo, G.J., Elangovan, B., Houghton, A.B., Malstrom, S., Avery, B.J., Ebb, R.G., Subramanian, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., *et al.* (1995). Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* 11, 1921-1928.

Bozyk, P.D., and Moore, B.B. (2011). Prostaglandin E2 and the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45, 445-452.

Brady, H.J., Gil-Gomez, G., Kirberg, J., and Berns, A.J. (1996). Bax alpha perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells. *EMBO J* 15, 6991-7001.

Bratton, S.B., Walker, G., Srinivasula, S.M., Sun, X.M., Butterworth, M., Alnemri, E.S., and Cohen, G.M. (2001). Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J* 20, 998-1009.

Bruey, J.M., Bruey-Sedano, N., Luciano, F., Zhai, D., Balpai, R., Xu, C., Kress, C.L., Bailly-Maitre, B., Li, X., Osterman, A., *et al.* (2007). Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. *Cell* 129, 45-56.

Budinger, G.R., Mutlu, G.M., Eisenbart, J., Fuller, A.C., Bellmeyer, A.A., Baker, C.M., Wilson, M., Ridge, K., Barrett, T.A., Lee, V.Y., *et al.* (2006). Proapoptotic Bid is required for pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4604-4609.

Buss, R.R., Sun, W., and Oppenheim, R.W. (2006). Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 29, 1-35.

Cabon, L., Galan-Malo, P., Bouharrou, A., Delavallee, L., Brunelle-Navas, M.N., Lorenzo, H.K., Gross, A., and Susin, S.A. (2012). BID regulates AIF-mediated

caspase-independent necroptosis by promoting BAX activation. *Cell Death Differ* 19, 245-256.

Cartron, P.F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F.M., and Juin, P. (2004). The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol Cell* 16, 807-818.

Cartron, P.F., Moreau, C., Oliver, L., Mayat, E., Meflah, K., and Vallette, F.M. (2002). Involvement of the N-terminus of Bax in its intracellular localization and function. *FEBS Lett* 512, 95-100.

Cartron, P.F., Priault, M., Oliver, L., Meflah, K., Manon, S., and Vallette, F.M. (2003). The N-terminal end of Bax contains a mitochondrial-targeting signal. *J Biol Chem* 278, 11633-11641.

Carvalho, A.C., Sharpe, J., Rosenstock, T.R., Teles, A.F., Youle, R.J., and Smaili, S.S. (2004). Bax affects intracellular Ca²⁺ stores and induces Ca²⁺ wave propagation. *Cell Death Differ* 11, 1265-1276.

Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A., March, C.J., Kronheim, S.R., Druck, T., Cannizzaro, L.A., *et al.* (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256, 97-100.

Cha, S.I., Groshong, S.D., Frankel, S.K., Edelman, B.L., Cosgrove, G.P., Terry-Powers, J.L., Remigio, L.K., Curran-Everett, D., Brown, K.K., Cool, C.D., *et al.* (2010). Compartmentalized expression of c-FLIP in lung tissues of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42, 140-148.

Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17, 393-403.

Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T., and Korsmeyer, S.J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8, 705-711.

Chilosi, M., Poletti, V., and Rossi, A. (2012). The pathogenesis of COPD and IPF: distinct horns of the same devil? *Respir Res* 13, 3.

Chilosi, M., Poletti, V., Zamo, A., Lestani, M., Montagna, L., Piccoli, P., Pedron, S., Bertaso, M., Scarpa, A., Murer, B., *et al.* (2003). Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 162, 1495-1502.

Chinnadurai, G., Vijayalingam, S., and Rashmi, R. (2008). BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene* 27 Suppl 1, S20-29.

Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 18, 157-164.

Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**, 1010-1014.

Cho, J.H. (2008). The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* **8**, 458-466.

Cho, Y.S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T.D., Guildford, M., and Chan, F.K. (2009). Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* **137**, 1112-1123.

Choi, S.S., Park, I.C., Yun, J.W., Sung, Y.C., Hong, S.I., and Shin, H.S. (1995). A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene* **11**, 1693-1698.

Choi, Y.B., and Nicholas, J. Bim nuclear translocation and inactivation by viral interferon regulatory factor. *PLoS Pathog* **6**, e1001031.

Chua, F., Gauldie, J., and Laurent, G.J. (2005). Pulmonary fibrosis: searching for model answers. *Am J Respir Cell Mol Biol* **33**, 9-13.

Cigna, N., Farrokhi Moshai, E., Brayer, S., Marchal-Somme, J., Wemeau-Stervinou, L., Fabre, A., Mal, H., Leseche, G., Dehoux, M., Soler, P., *et al.* (2012). The hedgehog system machinery controls transforming growth factor-beta-dependent myofibroblastic differentiation in humans: involvement in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* **181**, 2126-2137.

Cleary, M.L., Smith, S.D., and Sklar, J. (1986). Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* **47**, 19-28.

Coffey, E., Newman, D.R., and Sannes, P.L. (2013). Expression of fibroblast growth factor 9 in normal human lung and idiopathic pulmonary fibrosis. *J Histochem Cytochem* **61**, 671-679.

Cohen, H.Y., Lavu, S., Bitterman, K.J., Hekking, B., Imahiyerobo, T.A., Miller, C., Frye, R., Ploegh, H., Kessler, B.M., and Sinclair, D.A. (2004). Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell* **13**, 627-638.

Coon, D.R., Roberts, D.J., Loscertales, M., and Kradin, R. (2006). Differential epithelial expression of SHH and FOXF1 in usual and nonspecific interstitial pneumonia. *Exp Mol Pathol* **80**, 119-123.

Coultas, L., Bouillet, P., Loveland, K.L., Meachem, S., Perlman, H., Adams, J.M., and Strasser, A. (2005). Concomitant loss of proapoptotic BH3-only Bcl-2 antagonists Bik and Bim arrests spermatogenesis. *EMBO J* **24**, 3963-3973.

Coultas, L., Bouillet, P., Stanley, E.G., Brodnicki, T.C., Adams, J.M., and Strasser, A. (2004). Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bik/Blk/Nbk is expressed in hemopoietic and endothelial cells but is redundant for their programmed death. *Mol Cell Biol* **24**, 1570-1581.

- Coultas, L., Terzano, S., Thomas, T., Voss, A., Reid, K., Stanley, E.G., Scott, C.L., Bouillet, P., Bartlett, P., Ham, J., *et al.* (2007). Hrk/DP5 contributes to the apoptosis of select neuronal populations but is dispensable for haematopoietic cell apoptosis. *J Cell Sci* 120, 2044-2052.
- Coward, W.R., Watts, K., Feghali-Bostwick, C.A., Knox, A., and Pang, L. (2009). Defective histone acetylation is responsible for the diminished expression of cyclooxygenase 2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Mol Cell Biol* 29, 4325-4339.
- Crestani, B., Marchand-Adam, S., Quesnel, C., Plantier, L., Borensztajn, K., Marchal, J., Mailleux, A., Soler, P., and Dehoux, M. (2012). Hepatocyte growth factor and lung fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 9, 158-163.
- Croft, D.R., Coleman, M.L., Li, S., Robertson, D., Sullivan, T., Stewart, C.L., and Olson, M.F. (2005). Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *J Cell Biol* 168, 245-255.
- Cronkhite, J.T., Xing, C., Raghu, G., Chin, K.M., Torres, F., Rosenblatt, R.L., and Garcia, C.K. (2008). Telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 178, 729-737.
- Crook, N.E., Clem, R.J., and Miller, L.K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 67, 2168-2174.
- Cui, Q., Valentin, M., Janumyan, Y., and Yang, E. (2009). Bax^{-/-} bak^{-/-} cells exhibit p27 Thr198 phosphorylation and autophagy. *Autophagy* 5, 263-264.
- Czabotar, P.E., Westphal, D., Dewson, G., Ma, S., Hockings, C., Fairlie, W.D., Lee, E.F., Yao, S., Robin, A.Y., Smith, B.J., *et al.* (2013). Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *Cell* 152, 519-531.
- Danial, N.N., Gramm, C.F., Scorrano, L., Zhang, C.Y., Krauss, S., Ranger, A.M., Datta, S.R., Greenberg, M.E., Licklider, L.J., Lowell, B.B., *et al.* (2003). BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 424, 952-956.
- Danial, N.N., Walensky, L.D., Zhang, C.Y., Choi, C.S., Fisher, J.K., Molina, A.J., Datta, S.R., Pitter, K.L., Bird, G.H., Wikstrom, J.D., *et al.* (2008). Dual role of proapoptotic BAD in insulin secretion and beta cell survival. *Nat Med* 14, 144-153.
- Daniel, P.T., Pun, K.T., Ritschel, S., Sturm, I., Holler, J., Dorken, B., and Brown, R. (1999). Expression of the death gene Bik/Nbk promotes sensitivity to drug-induced apoptosis in corticosteroid-resistant T-cell lymphoma and prevents tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Blood* 94, 1100-1107.
- Datta, S.R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S.W., Yaffe, M.B., and Greenberg, M.E. (2000). 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* 6, 41-51.
- Datta, S.R., Ranger, A.M., Lin, M.Z., Sturgill, J.F., Ma, Y.C., Cowan, C.W., Dikkes, P., Korsmeyer, S.J., and Greenberg, M.E. (2002). Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. *Dev Cell* 3, 631-643.

- Davis, D.W., Weidner, D.A., Holian, A., and McConkey, D.J. (2000). Nitric oxide-dependent activation of p53 suppresses bleomycin-induced apoptosis in the lung. *J Exp Med* 192, 857-869.
- Day, C.L., Smits, C., Fan, F.C., Lee, E.F., Fairlie, W.D., and Hinds, M.G. (2008). Structure of the BH3 domains from the p53-inducible BH3-only proteins Noxa and Puma in complex with Mcl-1. *J Mol Biol* 380, 958-971.
- de Almagro, M.C., and Vucic, D. (2012). The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp Oncol* 34, 200-211.
- deCathelineau, A.M., and Henson, P.M. (2003). The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. *Essays Biochem* 39, 105-117.
- Decolonne, N., Wettstein, G., Kolb, M., Margetts, P., Garrido, C., Camus, P., and Bonniaud, P. (2010). Bleomycin induces pleural and subpleural fibrosis in the presence of carbon particles. *Eur Respir J* 35, 176-185.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., and Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 1, 112-119.
- Dehan, E., Bassermann, F., Guardavaccaro, D., Vasiliver-Shamis, G., Cohen, M., Lowes, K.N., Dustin, M., Huang, D.C., Taunton, J., and Pagano, M. (2009). betaTrCP- and Rsk1/2-mediated degradation of BimEL inhibits apoptosis. *Mol Cell* 33, 109-116.
- Delavallee, L., Cabon, L., Galan-Malo, P., Lorenzo, H.K., and Susin, S.A. (2011). AIF-mediated caspase-independent necroptosis: a new chance for targeted therapeutics. *IUBMB Life* 63, 221-232.
- Deng, X., Gao, F., and May, W.S. (2009). Protein phosphatase 2A inactivates Bcl2's antiapoptotic function by dephosphorylation and up-regulation of Bcl2-p53 binding. *Blood* 113, 422-428.
- Deng, X., Ruvolo, P., Carr, B., and May, W.S., Jr. (2000). Survival function of ERK1/2 as IL-3-activated, staurosporine-resistant Bcl2 kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1578-1583.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., and Martinou, J.C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 144, 891-901.
- Desmouliere, A., Redard, M., Darby, I., and Gabbiani, G. (1995). Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 146, 56-66.
- Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsedale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 17, 2215-2223.

Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388, 300-304.

Diwan, A., Koesters, A.G., Odley, A.M., Pushkaran, S., Baines, C.P., Spike, B.T., Daria, D., Jegga, A.G., Geiger, H., Aronow, B.J., *et al.* (2007). Unrestrained erythroblast development in Nix^{-/-} mice reveals a mechanism for apoptotic modulation of erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6794-6799.

Dlugosz, P.J., Billen, L.P., Annis, M.G., Zhu, W., Zhang, Z., Lin, J., Leber, B., and Andrews, D.W. (2006). Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *EMBO J* 25, 2287-2296.

Donovan, J., Shiwen, X., Norman, J., and Abraham, D. Platelet-derived growth factor alpha and beta receptors have overlapping functional activities towards fibroblasts. *Fibrogenesis Tissue Repair* 6, 10.

Driscoll, B., Buckley, S., Bui, K.C., Anderson, K.D., and Warburton, D. (2000). Telomerase in alveolar epithelial development and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L1191-1198.

Du, H., Wolf, J., Schafer, B., Moldoveanu, T., Chipuk, J.E., and Kuwana, T. (2011). BH3 domains other than Bim and Bid can directly activate Bax/Bak. *J Biol Chem* 286, 491-501.

Dubois, T., Howell, S., Amess, B., Kerai, P., Learmonth, M., Madrazo, J., Chaudhri, M., Rittinger, K., Scarabel, M., Soneji, Y., *et al.* (1997). Structure and sites of phosphorylation of 14-3-3 protein: role in coordinating signal transduction pathways. *J Protein Chem* 16, 513-522.

Duffield, J.S., Lupher, M., Thannickal, V.J., and Wynn, T.A. Host responses in tissue repair and fibrosis. *Annu Rev Pathol* 8, 241-276.

Echeverry, N., Bachmann, D., Ke, F., Strasser, A., Simon, H.U., and Kaufmann, T. (2013). Intracellular localization of the BCL-2 family member BOK and functional implications. *Cell Death Differ* 20, 785-799.

Eckelman, B.P., Salvesen, G.S., and Scott, F.L. (2006). Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* 7, 988-994.

Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145, 104-116.

Ellis, R.E., Yuan, J.Y., and Horvitz, H.R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7, 663-698.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J.C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20, 929-935.

- Fabre, A., Marchal-Somme, J., Marchand-Adam, S., Quesnel, C., Borie, R., Dehoux, M., Ruffie, C., Callebert, J., Launay, J.M., Henin, D., *et al.* (2008). Modulation of bleomycin-induced lung fibrosis by serotonin receptor antagonists in mice. *Eur Respir J* 32, 426-436.
- Fernandez, I.E., and Eickelberg, O. (2012). New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 380, 680-688.
- Frankel, S.K., Cosgrove, G.P., Cha, S.I., Cool, C.D., Wynes, M.W., Edelman, B.L., Brown, K.K., and Riches, D.W. (2006). TNF-alpha sensitizes normal and fibrotic human lung fibroblasts to Fas-induced apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34, 293-304.
- Fridlender, Z.G., Cohen, P.Y., Golan, O., Arish, N., Wallach-Dayana, S., and Breuer, R. (2007). Telomerase activity in bleomycin-induced epithelial cell apoptosis and lung fibrosis. *Eur Respir J* 30, 205-213.
- Fridman, J.S., and Lowe, S.W. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22, 9030-9040.
- Fu, N.Y., Sukumaran, S.K., Kerk, S.Y., and Yu, V.C. (2009). Baxbeta: a constitutively active human Bax isoform that is under tight regulatory control by the proteasomal degradation mechanism. *Mol Cell* 33, 15-29.
- Fuentes-Prior, P., and Salvesen, G.S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 384, 201-232.
- Fujise, K., Zhang, D., Liu, J., and Yeh, E.T. (2000). Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* 275, 39458-39465.
- Fujita, E., Egashira, J., Urase, K., Kuida, K., and Momoi, T. (2001). Caspase-9 processing by caspase-3 via a feedback amplification loop in vivo. *Cell Death Differ* 8, 335-344.
- Gabbiani, G., and Majno, G. (1972). Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study. *Am J Pathol* 66, 131-146.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C., and Kroemer, G. Non-apoptotic functions of apoptosis-regulatory proteins. *EMBO Rep* 13, 322-330.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., *et al.* (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19, 107-120.
- Gao, S., Fu, W., Durrenberger, M., De Geyter, C., and Zhang, H. (2005). Membrane translocation and oligomerization of hBok are triggered in response to apoptotic stimuli and Bnip3. *Cell Mol Life Sci* 62, 1015-1024.
- Garcia-Saez, A.J., Coraiola, M., Dalla Serra, M., Mingarro, I., Menestrina, G., and Salgado, J. (2005). Peptides derived from apoptotic Bax and Bid reproduce the pore activity of the parent full-length proteins. *Biophys J* 88, 3976-3990.

Garcia-Saez, A.J., Coraiola, M., Serra, M.D., Mingarro, I., Muller, P., and Salgado, J. (2006). Peptides corresponding to helices 5 and 6 of Bax can independently form large lipid pores. *FEBS J* 273, 971-981.

Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M.L., Pitter, K., Bird, G.H., Katz, S.G., Tu, H.C., Kim, H., Cheng, E.H., Tjandra, N., *et al.* (2008). BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* 455, 1076-1081.

George, N.M., Evans, J.J., and Luo, X. (2007). A three-helix homo-oligomerization domain containing BH3 and BH1 is responsible for the apoptotic activity of Bax. *Genes Dev* 21, 1937-1948.

Gerecova, G., Kopanicova, J., Jaka, P., Behalova, L., Juhasova, B., Bhatia-Kissova, I., Forte, M., Polcic, P., and Mentel, M. (2013). BH3-only proteins Noxa, Bik, Bmf, and Bid activate Bax and Bak indirectly when studied in yeast model. *FEMS Yeast Res.*

Germain, M., Mathai, J.P., McBride, H.M., and Shore, G.C. (2005). Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J* 24, 1546-1556.

Germain, M., Mathai, J.P., and Shore, G.C. (2002). BH-3-only BIK functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria. *J Biol Chem* 277, 18053-18060.

Gibson, L., Holmgreen, S.P., Huang, D.C., Bernard, O., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sutherland, G.R., Baker, E., Adams, J.M., and Cory, S. (1996). bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* 13, 665-675.

Gil-Gomez, G., Berns, A., and Brady, H.J. (1998). A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl-2 modulate Cdk2 activation during thymocyte apoptosis. *EMBO J* 17, 7209-7218.

Gogvadze, V., Robertson, J.D., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2001). Cytochrome c release occurs via Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent mechanisms that are regulated by Bax. *J Biol Chem* 276, 19066-19071.

Golan-Gerstl, R., Wallach-Dayana, S.B., Amir, G., and Breuer, R. (2007). Epithelial cell apoptosis by fas ligand-positive myofibroblasts in lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36, 270-275.

Golan-Gerstl, R., Wallach-Dayana, S.B., Zisman, P., Cardoso, W.V., Goldstein, R.H., and Breuer, R. (2012). Cellular FLICE-like inhibitory protein deviates myofibroblast fas-induced apoptosis toward proliferation during lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47, 271-279.

Gomez, G., Lee, H.M., He, Q., Englander, E.W., Uchida, T., and Greeley, G.H., Jr. (2001). Acute pancreatitis signals activation of apoptosis-associated and survival genes in mice. *Exp Biol Med* (Maywood) 226, 692-700.

Gonzalvez, F., Schug, Z.T., Houtkooper, R.H., MacKenzie, E.D., Brooks, D.G., Wanders, R.J., Petit, P.X., Vaz, F.M., and Gottlieb, E. (2008). Cardiolipin provides an essential activating platform for caspase-8 on mitochondria. *J Cell Biol* 183, 681-696.

Goping, I.S., Gross, A., Lavoie, J.N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., Korsmeyer, S.J., and Shore, G.C. (1998). Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol* *143*, 207-215.

Goyal, L., McCall, K., Agapite, J., Hartwig, E., and Steller, H. (2000). Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *EMBO J* *19*, 589-597.

Grad, J.M., Zeng, X.R., and Boise, L.H. (2000). Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT. *Curr Opin Oncol* *12*, 543-549.

Greenhalgh, S.N., Iredale, J.P., and Henderson, N.C. (2013). Origins of fibrosis: pericytes take centre stage. *F1000Prime Rep* *5*, 37.

Greer, R.M., Peyton, M., Larsen, J.E., Girard, L., Xie, Y., Gazdar, A.F., Harran, P., Wang, L., Brekken, R.A., Wang, X., *et al.* (2011). SMAC mimetic (JP1201) sensitizes non-small cell lung cancers to multiple chemotherapy agents in an IAP-dependent but TNF-alpha-independent manner. *Cancer Res* *71*, 7640-7648.

Grespi, F., Soratroi, C., Krumschnabel, G., Sohm, B., Ploner, C., Geley, S., Hengst, L., Hacker, G., and Villunger, A. (2010). BH3-only protein Bmf mediates apoptosis upon inhibition of CAP-dependent protein synthesis. *Cell Death Differ* *17*, 1672-1683.

Griffiths, G.J., Dubrez, L., Morgan, C.P., Jones, N.A., Whitehouse, J., Corfe, B.M., Dive, C., and Hickman, J.A. (1999). Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* *144*, 903-914.

Gunther, C., Martini, E., Wittkopf, N., Amann, K., Weigmann, B., Neumann, H., Waldner, M.J., Hedrick, S.M., Tenzer, S., Neurath, M.F., *et al.* (2011). Caspase-8 regulates TNF-alpha-induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature* *477*, 335-339.

Gupte, V.V., Ramasamy, S.K., Reddy, R., Lee, J., Weinreb, P.H., Violette, S.M., Guenther, A., Warburton, D., Driscoll, B., Minoo, P., *et al.* (2009). Overexpression of fibroblast growth factor-10 during both inflammatory and fibrotic phases attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* *180*, 424-436.

Gurzov, E.N., Ortis, F., Cunha, D.A., Gosset, G., Li, M., Cardozo, A.K., and Eizirik, D.L. (2009). Signaling by IL-1beta+IFN-gamma and ER stress converge on DP5/Hrk activation: a novel mechanism for pancreatic beta-cell apoptosis. *Cell Death Differ* *16*, 1539-1550.

Hagimoto, N., Kuwano, K., Inoshima, I., Yoshimi, M., Nakamura, N., Fujita, M., Maeyama, T., and Hara, N. (2002). TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *J Immunol* *168*, 6470-6478.

Hagimoto, N., Kuwano, K., Miyazaki, H., Kunitake, R., Fujita, M., Kawasaki, M., Kaneko, Y., and Hara, N. (1997). Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen. *Am J Respir Cell Mol Biol* *17*, 272-278.

- Hall, P.A., Coates, P.J., Ansari, B., and Hopwood, D. (1994). Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 107 (Pt 12), 3569-3577.
- Hamasaki, A., Sendo, F., Nakayama, K., Ishida, N., Negishi, I., Nakayama, K., and Hatakeyama, S. (1998). Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene. *J Exp Med* 188, 1985-1992.
- Han, J., Flemington, C., Houghton, A.B., Gu, Z., Zambetti, G.P., Lutz, R.J., Zhu, L., and Chittenden, T. (2001). Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11318-11323.
- Han, J., Goldstein, L.A., Hou, W., Gastman, B.R., and Rabinowich, H. Regulation of mitochondrial apoptotic events by p53-mediated disruption of complexes between antiapoptotic Bcl-2 members and Bim. *J Biol Chem* 285, 22473-22483.
- Harris, C.A., and Johnson, E.M., Jr. (2001). BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons. *J Biol Chem* 276, 37754-37760.
- Hay, B.A. (2000). Understanding IAP function and regulation: a view from *Drosophila*. *Cell Death Differ* 7, 1045-1056.
- He, G., Siddik, Z.H., Huang, Z., Wang, R., Koomen, J., Kobayashi, R., Khokhar, A.R., and Kuang, J. (2005). Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene* 24, 2929-2943.
- Helminen, H.J., and Ericsson, J.L. (1968). Studies on mammary gland involution. I. On the ultrastructure of the lactating mammary gland. *J Ultrastruct Res* 25, 193-213.
- Hetz, C., Bernasconi, P., Fisher, J., Lee, A.H., Bassik, M.C., Antonsson, B., Brandt, G.S., Iwakoshi, N.N., Schinzel, A., Glimcher, L.H., *et al.* (2006). Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science* 312, 572-576.
- Hinds, M.G., Lackmann, M., Skea, G.L., Harrison, P.J., Huang, D.C., and Day, C.L. (2003). The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity. *EMBO J* 22, 1497-1507.
- Hinz, B. (2009). Tissue stiffness, latent TGF-beta1 activation, and mechanical signal transduction: implications for the pathogenesis and treatment of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* 11, 120-126.
- Hinz, B., Gabbiani, G., and Chaponnier, C. (2002). The NH2-terminal peptide of alpha-smooth muscle actin inhibits force generation by the myofibroblast in vitro and in vivo. *J Cell Biol* 157, 657-663.
- Hinz, B., Phan, S.H., Thannickal, V.J., Prunotto, M., Desmouliere, A., Varga, J., De Wever, O., Mareel, M., and Gabbiani, G. (2012). Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol* 180, 1340-1355.

- Hitomi, J., Christofferson, D.E., Ng, A., Yao, J., Degterev, A., Xavier, R.J., and Yuan, J. (2008). Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* 135, 1311-1323.
- Hoetelmans, R., van Slooten, H.J., Keijzer, R., Erkeland, S., van de Velde, C.J., and Dierendonck, J.H. (2000). Bcl-2 and Bax proteins are present in interphase nuclei of mammalian cells. *Cell Death Differ* 7, 384-392.
- Hoetelmans, R.W. (2004). Nuclear partners of Bcl-2: Bax and PML. *DNA Cell Biol* 23, 351-354.
- Holland, J.A., Pritchard, K.A., Pappolla, M.A., Wolin, M.S., Rogers, N.J., and Stemerman, M.B. (1990). Bradykinin induces superoxide anion release from human endothelial cells. *J Cell Physiol* 143, 21-25.
- Holmgreen, S.P., Huang, D.C., Adams, J.M., and Cory, S. (1999). Survival activity of Bcl-2 homologs Bcl-w and A1 only partially correlates with their ability to bind pro-apoptotic family members. *Cell Death Differ* 6, 525-532.
- Horowitz, J.C., Rogers, D.S., Sharma, V., Vittal, R., White, E.S., Cui, Z., and Thannickal, V.J. (2007). Combinatorial activation of FAK and AKT by transforming growth factor-beta1 confers an anoikis-resistant phenotype to myofibroblasts. *Cell Signal* 19, 761-771.
- Hsu, S.Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., and Hsueh, A.J. (1997a). Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12401-12406.
- Hsu, Y.T., Wolter, K.G., and Youle, R.J. (1997b). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3668-3672.
- Hu, S., and Yang, X. (2003). Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *J Biol Chem* 278, 10055-10060.
- Huang, J.Y., Cui, S.Y., Chen, Y.T., Song, H.Z., Huang, G.C., Feng, B., Sun, M., De, W., Wang, R., and Chen, L.B. (2013). MicroRNA-650 was a prognostic factor in human lung adenocarcinoma and confers the docetaxel chemoresistance of lung adenocarcinoma cells via regulating Bcl-2/Bax expression. *PLoS One* 8, e72615.
- Huang, S.K., Fisher, A.S., Scruggs, A.M., White, E.S., Hogaboam, C.M., Richardson, B.C., and Peters-Golden, M. (2010). Hypermethylation of PTGER2 confers prostaglandin E2 resistance in fibrotic fibroblasts from humans and mice. *Am J Pathol* 177, 2245-2255.
- Huang, S.K., White, E.S., Wettlaufer, S.H., Grifka, H., Hogaboam, C.M., Thannickal, V.J., Horowitz, J.C., and Peters-Golden, M. (2009). Prostaglandin E(2) induces fibroblast apoptosis by modulating multiple survival pathways. *FASEB J* 23, 4317-4326.
- Huang, X., Yang, N., Fiore, V.F., Barker, T.H., Sun, Y., Morris, S.W., Ding, Q., Thannickal, V.J., and Zhou, Y. (2012). Matrix stiffness-induced myofibroblast

differentiation is mediated by intrinsic mechanotransduction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47, 340-348.

Huang, Y., Rich, R.L., Myszka, D.G., and Wu, H. (2003). Requirement of both the second and third BIR domains for the relief of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated caspase inhibition by Smac. *J Biol Chem* 278, 49517-49522.

Hubbard, R., Lewis, S., Richards, K., Johnston, I., and Britton, J. (1996). Occupational exposure to metal or wood dust and aetiology of cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet* 347, 284-289.

Huntington, N.D., Puthalakath, H., Gunn, P., Naik, E., Michalak, E.M., Smyth, M.J., Tabarias, H., Degli-Esposti, M.A., Dewson, G., Willis, S.N., *et al.* (2007). Interleukin 15-mediated survival of natural killer cells is determined by interactions among Bim, Noxa and Mcl-1. *Nat Immunol* 8, 856-863.

Hutcheson, J., Scatizzi, J.C., Bickel, E., Brown, N.J., Bouillet, P., Strasser, A., and Perlman, H. (2005). Combined loss of proapoptotic genes Bak or Bax with Bim synergizes to cause defects in hematopoiesis and in thymocyte apoptosis. *J Exp Med* 201, 1949-1960.

Imaizumi, K., Benito, A., Kiryu-Seo, S., Gonzalez, V., Inohara, N., Lieberman, A.P., Kiyama, H., and Nunez, G. (2004). Critical role for DP5/Harakiri, a Bcl-2 homology domain 3-only Bcl-2 family member, in axotomy-induced neuronal cell death. *J Neurosci* 24, 3721-3725.

Imaizumi, K., Tsuda, M., Imai, Y., Wanaka, A., Takagi, T., and Tohyama, M. (1997). Molecular cloning of a novel polypeptide, DP5, induced during programmed neuronal death. *J Biol Chem* 272, 18842-18848.

Inohara, N., Ding, L., Chen, S., and Nunez, G. (1997). harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J* 16, 1686-1694.

Inoshima, I., Kuwano, K., Hamada, N., Yoshimi, M., Maeyama, T., Hagimoto, N., Nakanishi, Y., and Hara, N. (2004). Induction of CDK inhibitor p21 gene as a new therapeutic strategy against pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286, L727-733.

Ishikawa, H., and Marshall, W.F. (2011). Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 222-234.

Itoh, K., Nakamura, K., Iijima, M., and Sesaki, H. (2013). Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends Cell Biol* 23, 64-71.

Jamil, S., Sobouti, R., Hojabrpour, P., Raj, M., Kast, J., and Duronio, V. (2005). A proteolytic fragment of Mcl-1 exhibits nuclear localization and regulates cell growth by interaction with Cdk1. *Biochem J* 387, 659-667.

Janumyan, Y., Cui, Q., Yan, L., Sansam, C.G., Valentin, M., and Yang, E. (2008). G0 function of BCL2 and BCL-xL requires BAX, BAK, and p27 phosphorylation by Mirk, revealing a novel role of BAX and BAK in quiescence regulation. *J Biol Chem* 283, 34108-34120.

- Janumyan, Y.M., Sansam, C.G., Chattopadhyay, A., Cheng, N., Soucie, E.L., Penn, L.Z., Andrews, D., Knudson, C.M., and Yang, E. (2003). Bcl-xL/Bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry. *EMBO J* 22, 5459-5470.
- Jeffers, J.R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., MacLean, K.H., Han, J., Chittenden, T., Ihle, J.N., *et al.* (2003). Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* 4, 321-328.
- Jiang, X., Tsitsiou, E., Herrick, S.E., and Lindsay, M.A. (2010). MicroRNAs and the regulation of fibrosis. *FEBS J* 277, 2015-2021.
- Jiao, S., and Li, Z. (2011). Nonapoptotic function of BAD and BAX in long-term depression of synaptic transmission. *Neuron* 70, 758-772.
- Jin, K.L., Graham, S.H., Mao, X.O., He, X., Nagayama, T., Simon, R.P., and Greenberg, D.A. (2001). Bax kappa, a novel Bax splice variant from ischemic rat brain lacking an ART domain, promotes neuronal cell death. *J Neurochem* 77, 1508-1519.
- Jin, S., Kalkum, M., Overholtzer, M., Stoffel, A., Chait, B.T., and Levine, A.J. (2003). CIAP1 and the serine protease HTRA2 are involved in a novel p53-dependent apoptosis pathway in mammals. *Genes Dev* 17, 359-367.
- Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., and Krysko, D.V. (2013). Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* 38, 209-223.
- Kagan, H.M., and Li, W. (2003). Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem* 88, 660-672.
- Kamer, I., Sarig, R., Zaltsman, Y., Niv, H., Oberkovitz, G., Regev, L., Haimovich, G., Lerenthal, Y., Marcellus, R.C., and Gross, A. (2005). Proapoptotic BID is an ATM effector in the DNA-damage response. *Cell* 122, 593-603.
- Kang, H.R., Cho, S.J., Lee, C.G., Homer, R.J., and Elias, J.A. (2007). Transforming growth factor (TGF)-beta1 stimulates pulmonary fibrosis and inflammation via a Bax-dependent, bid-activated pathway that involves matrix metalloproteinase-12. *J Biol Chem* 282, 7723-7732.
- Ke, F., Bouillet, P., Kaufmann, T., Strasser, A., Kerr, J., and Voss, A.K. (2013). Consequences of the combined loss of BOK and BAK or BOK and BAX. *Cell Death Dis* 4, e650.
- Ke, F., Voss, A., Kerr, J.B., O'Reilly, L.A., Tai, L., Echeverry, N., Bouillet, P., Strasser, A., and Kaufmann, T. (2012). BCL-2 family member BOK is widely expressed but its loss has only minimal impact in mice. *Cell Death Differ* 19, 915-925.
- Ke, N., Godzik, A., and Reed, J.C. (2001). Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak. *J Biol Chem* 276, 12481-12484.
- Keerthisingam, C.B., Jenkins, R.G., Harrison, N.K., Hernandez-Rodriguez, N.A., Booth, H., Laurent, G.J., Hart, S.L., Foster, M.L., and McAnulty, R.J. (2001). Cyclooxygenase-2 deficiency results in a loss of the anti-proliferative response to

transforming growth factor-beta in human fibrotic lung fibroblasts and promotes bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol* 158, 1411-1422.

Kerr, J.F. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181-182, 471-474.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.

Kerr, L.E., Birse-Archbold, J.L., Short, D.M., McGregor, A.L., Heron, I., Macdonald, D.C., Thompson, J., Carlson, G.J., Kelly, J.S., McCulloch, J., *et al.* (2007). Nucleophosmin is a novel Bax chaperone that regulates apoptotic cell death. *Oncogene* 26, 2554-2562.

Kilbride, S.M., Farrelly, A.M., Bonner, C., Ward, M.W., Nyhan, K.C., Concannon, C.G., Wollheim, C.B., Byrne, M.M., and Prehn, J.H. (2010). AMP-activated protein kinase mediates apoptosis in response to bioenergetic stress through activation of the pro-apoptotic Bcl-2 homology domain-3-only protein BMF. *J Biol Chem* 285, 36199-36206.

Kim, T.H., Kim, S.H., Seo, J.Y., Chung, H., Kwak, H.J., Lee, S.K., Yoon, H.J., Shin, D.H., Park, S.S., and Sohn, J.W. (2011). Blockade of the Wnt/beta-catenin pathway attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Tohoku J Exp Med* 223, 45-54.

Kimura, H. Histone modifications for human epigenome analysis. *J Hum Genet* 58, 439-445.

King, T.E., Jr., Pardo, A., and Selman, M. (2011). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 378, 1949-1961.

Kinnula, V.L., Chang, L., Everitt, J.I., and Crapo, J.D. (1992). Oxidants and antioxidants in alveolar epithelial type II cells: in situ, freshly isolated, and cultured cells. *Am J Physiol* 262, L69-77.

Kinnula, V.L., Crapo, J.D., and Raivio, K.O. (1995). Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab Invest* 73, 3-19.

Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Keller, J.L., Haddad, J., Jr., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A., and Dalla-Favera, R. (2003). Gene expression dynamics during germinal center transit in B cells. *Ann N Y Acad Sci* 987, 166-172.

Knudson, C.M., Tung, K.S., Tourtellotte, W.G., Brown, G.A., and Korsmeyer, S.J. (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270, 96-99.

Ko, J.K., Lee, M.J., Cho, S.H., Cho, J.A., Lee, B.Y., Koh, J.S., Lee, S.S., Shim, Y.H., and Kim, C.W. (2003). Bfl-1S, a novel alternative splice variant of Bfl-1, localizes in the nucleus via its C-terminus and prevents cell death. *Oncogene* 22, 2457-2465.

Koehler, B.C., Scherr, A.L., Lorenz, S., Urbanik, T., Kautz, N., Elssner, C., Welte, S., Bermejo, J.L., Jager, D., and Schulze-Bergkamen, H. (2013). Beyond cell death - antiapoptotic bcl-2 proteins regulate migration and invasion of colorectal cancer cells in vitro. *PLoS One* 8, e76446.

- Koli, K., Myllarniemi, M., Vuorinen, K., Salmenkivi, K., Ryyanen, M.J., Kinnula, V.L., and Keski-Oja, J. (2006). Bone morphogenetic protein-4 inhibitor gremlin is overexpressed in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 169, 61-71.
- Kolodsick, J.E., Peters-Golden, M., Larios, J., Toews, G.B., Thannickal, V.J., and Moore, B.B. (2003). Prostaglandin E2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E. prostanoid receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29, 537-544.
- Konigshoff, M., Balsara, N., Pfaff, E.M., Kramer, M., Chrobak, I., Seeger, W., and Eickelberg, O. (2008). Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* 3, e2142.
- Konigshoff, M., Dumitrascu, R., Udalov, S., Amarie, O.V., Reiter, R., Grimminger, F., Seeger, W., Schermuly, R.T., and Eickelberg, O. (2010). Increased expression of 5-hydroxytryptamine2A/B receptors in idiopathic pulmonary fibrosis: a rationale for therapeutic intervention. *Thorax* 65, 949-955.
- Konigshoff, M., and Eickelberg, O. (2010). WNT signaling in lung disease: a failure or a regeneration signal? *Am J Respir Cell Mol Biol* 42, 21-31.
- Konigshoff, M., Kramer, M., Balsara, N., Wilhelm, J., Amarie, O.V., Jahn, A., Rose, F., Fink, L., Seeger, W., Schaefer, L., *et al.* (2009). WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 119, 772-787.
- Korfei, M., Ruppert, C., Mahavadi, P., Henneke, I., Markart, P., Koch, M., Lang, G., Fink, L., Bohle, R.M., Seeger, W., *et al.* (2008). Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 178, 838-846.
- Korsmeyer, S.J., Shutter, J.R., Veis, D.J., Merry, D.E., and Oltvai, Z.N. (1993). Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 4, 327-332.
- Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P., and Craig, R.W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3516-3520.
- Krajewska, M., Kitada, S., Winter, J.N., Variakojis, D., Lichtenstein, A., Zhai, D., Cuddy, M., Huang, X., Luciano, F., Baker, C.H., *et al.* (2008). Bcl-B expression in human epithelial and nonepithelial malignancies. *Clin Cancer Res* 14, 3011-3021.
- Kropski, J.A., Lawson, W.E., Young, L.R., and Blackwell, T.S. (2013). Genetic studies provide clues on the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Dis Model Mech* 6, 9-17.
- Ku, B., Liang, C., Jung, J.U., and Oh, B.H. (2011). Evidence that inhibition of BAX activation by BCL-2 involves its tight and preferential interaction with the BH3 domain of BAX. *Cell Res* 21, 627-641.
- Kucharczak, J.F., Simmons, M.J., Duckett, C.S., and Gelinas, C. (2005). Constitutive proteasome-mediated turnover of Bfl-1/A1 and its processing in

response to TNF receptor activation in FL5.12 pro-B cells convert it into a prodeath factor. *Cell Death Differ* 12, 1225-1239.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev* 24, 2463-2479.

Kulasekaran, P., Scavone, C.A., Rogers, D.S., Arenberg, D.A., Thannickal, V.J., and Horowitz, J.C. (2009). Endothelin-1 and transforming growth factor-beta1 independently induce fibroblast resistance to apoptosis via AKT activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41, 484-493.

Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N., and Kobayashi, Y. (2003). Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* 171, 4672-4679.

Kuwano, K., Kunitake, R., Kawasaki, M., Nomoto, Y., Hagimoto, N., Nakanishi, Y., and Hara, N. (1996). P21Waf1/Cip1/Sdi1 and p53 expression in association with DNA strand breaks in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 154, 477-483.

Labi, V., Erlacher, M., Kiessling, S., Manzl, C., Frenzel, A., O'Reilly, L., Strasser, A., and Villunger, A. (2008). Loss of the BH3-only protein Bmf impairs B cell homeostasis and accelerates gamma irradiation-induced thymic lymphoma development. *J Exp Med* 205, 641-655.

Lam, A.K., and Galione, A. The endoplasmic reticulum and junctional membrane communication during calcium signaling. *Biochim Biophys Acta* 1833, 2542-2559.

Lamkanfi, M., and Dixit, V.M. (2009). Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol Rev* 227, 95-105.

Landsman, L., and Jung, S. (2007). Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 179, 3488-3494.

Laulier, C., and Lopez, B.S. The secret life of Bcl-2: apoptosis-independent inhibition of DNA repair by Bcl-2 family members. *Mutat Res* 751, 247-257.

Lavrik, I.N., Golks, A., and Krammer, P.H. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 115, 2665-2672.

Lawson, W.E., Cheng, D.S., Degryse, A.L., Tanjore, H., Polosukhin, V.V., Xu, X.C., Newcomb, D.C., Jones, B.R., Roldan, J., Lane, K.B., *et al.* (2011). Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10562-10567.

Lawson, W.E., Crossno, P.F., Polosukhin, V.V., Roldan, J., Cheng, D.S., Lane, K.B., Blackwell, T.R., Xu, C., Markin, C., Ware, L.B., *et al.* (2008). Endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells is prominent in IPF: association with altered surfactant protein processing and herpesvirus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, L1119-1126.

Lazo, J.S., and Humphreys, C.J. (1983). Lack of metabolism as the biochemical basis of bleomycin-induced pulmonary toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 3064-3068.

- Leu, J.I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., and George, D.L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* 6, 443-450.
- Leuenroth, S.J., Grutkoski, P.S., Ayala, A., and Simms, H.H. (2000). The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis. *J Leukoc Biol* 68, 158-166.
- Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237, 1154-1162.
- Li, H., Chen, Y., Jones, A.F., Sanger, R.H., Collis, L.P., Flannery, R., McNay, E.C., Yu, T., Schwarzenbacher, R., Bossy, B., *et al.* (2008). Bcl-xL induces Drp1-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2169-2174.
- Li, H., Kobayashi, M., Blonska, M., You, Y., and Lin, X. (2006a). Ubiquitination of RIP is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 281, 13636-13643.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Li, J., Lee, B., and Lee, A.S. (2006b). Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem* 281, 7260-7270.
- Li, J., and Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27, 6194-6206.
- Li, L.J., Gao, L.B., Lv, M.L., Dong, W., Su, X.W., Liang, W.B., and Zhang, L. (2011a). Association between SNPs in pre-miRNA and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Biochem* 44, 813-816.
- Li, Y.J., Wang, X.Q., Sato, T., Kanaji, N., Nakanishi, M., Kim, M., Michalski, J., Nelson, A.J., Sun, J.H., Farid, M., *et al.* (2011b). Prostaglandin E(2) inhibits human lung fibroblast chemotaxis through disparate actions on different E-prostanoid receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44, 99-107.
- Li, Z., Jo, J., Jia, J.M., Lo, S.C., Whitcomb, D.J., Jiao, S., Cho, K., and Sheng, M. (2010). Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. *Cell* 141, 859-871.
- Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B.H., and Jung, J.U. (2006). Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol* 8, 688-699.
- Lin, E.Y., Orlofsky, A., Berger, M.S., and Prystowsky, M.B. (1993). Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol* 151, 1979-1988.
- Lin, J.H., Walter, P., and Yen, T.S. (2008). Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 3, 399-425.

- Lind, E.F., Wayne, J., Wang, Q.Z., Staeva, T., Stolzer, A., and Petrie, H.T. (1999). Bcl-2-induced changes in E2F regulatory complexes reveal the potential for integrated cell cycle and cell death functions. *J Immunol* 162, 5374-5379.
- Lindenboim, L., Blacher, E., Borner, C., and Stein, R. (2010). Regulation of stress-induced nuclear protein redistribution: a new function of Bax and Bak uncoupled from Bcl-x(L). *Cell Death Differ* 17, 346-359.
- Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., *et al.* (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 6, 1389-1399.
- Lithgow, T., van Driel, R., Bertram, J.F., and Strasser, A. (1994). The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ* 5, 411-417.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175-184.
- Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.L., Dillon, C.P., and Green, D.R. (2011). A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol Cell* 44, 517-531.
- Lopez, J., John, S.W., Tenev, T., Rautureau, G.J., Hinds, M.G., Francalanci, F., Wilson, R., Broemer, M., Santoro, M.M., Day, C.L., *et al.* (2011). CARD-mediated autoinhibition of cIAP1's E3 ligase activity suppresses cell proliferation and migration. *Mol Cell* 42, 569-583.
- Lu, C., Wang, Y., Furukawa, K., Fu, W., Ouyang, X., and Mattson, M.P. (2006). Evidence that caspase-1 is a negative regulator of AMPA receptor-mediated long-term potentiation at hippocampal synapses. *J Neurochem* 97, 1104-1110.
- Lucken-Ardjomande, S., Montessuit, S., and Martinou, J.C. (2008). Contributions to Bax insertion and oligomerization of lipids of the mitochondrial outer membrane. *Cell Death Differ* 15, 929-937.
- Lukashchuk, N., and Vousden, K.H. (2007). Ubiquitination and degradation of mutant p53. *Mol Cell Biol* 27, 8284-8295.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.
- Maher, T.M., Evans, I.C., Bottoms, S.E., Mercer, P.F., Thorley, A.J., Nicholson, A.G., Laurent, G.J., Tetley, T.D., Chambers, R.C., and McAnulty, R.J. (2010). Diminished prostaglandin E2 contributes to the apoptosis paradox in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 182, 73-82.
- Maia, S., Haining, W.N., Ansen, S., Xia, Z., Armstrong, S.A., Seth, N.P., Ghia, P., den Boer, M.L., Pieters, R., Sallan, S.E., *et al.* (2005). Gene expression profiling

identifies BAX-delta as a novel tumor antigen in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 65, 10050-10058.

Mailleux, A.A., Moshai, E.F., and Crestani, B. (2013). Sonic Hedgehog signaling in pulmonary fibrosis: a spiky issue? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 304, L391-393.

Mailleux, A.A., Overholtzer, M., Schmelzle, T., Bouillet, P., Strasser, A., and Brugge, J.S. (2007). BIM regulates apoptosis during mammary ductal morphogenesis, and its absence reveals alternative cell death mechanisms. *Dev Cell* 12, 221-234.

Maiuri, M.C., Criollo, A., Tasdemir, E., Vicencio, J.M., Tajeddine, N., Hickman, J.A., Geneste, O., and Kroemer, G. (2007a). BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy* 3, 374-376.

Maiuri, M.C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., *et al.* (2007b). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* 26, 2527-2539.

Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007c). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 741-752.

Marani, M., Tenev, T., Hancock, D., Downward, J., and Lemoine, N.R. (2002). Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. *Mol Cell Biol* 22, 3577-3589.

Marchand-Adam, S., Fabre, A., Mailleux, A.A., Marchal, J., Quesnel, C., Kataoka, H., Aubier, M., Dehoux, M., Soler, P., and Crestani, B. (2006). Defect of pro-hepatocyte growth factor activation by fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 174, 58-66.

Marchand-Adam, S., Marchal, J., Cohen, M., Soler, P., Gerard, B., Castier, Y., Leseche, G., Valeyre, D., Mal, H., Aubier, M., *et al.* (2003). Defect of hepatocyte growth factor secretion by fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 1156-1161.

Marchand-Adam, S., Plantier, L., Bernuau, D., Legrand, A., Cohen, M., Marchal, J., Soler, P., Leseche, G., Mal, H., Aubier, M., *et al.* (2005). Keratinocyte growth factor expression by fibroblasts in pulmonary fibrosis: poor response to interleukin-1beta. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32, 470-477.

Markwald, R., Eisenberg, C., Eisenberg, L., Trusk, T., and Sugi, Y. (1996). Epithelial-mesenchymal transformations in early avian heart development. *Acta Anat (Basel)* 156, 173-186.

McIlwain, D.R., Berger, T., and Mak, T.W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a008656.

- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U.M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11, 577-590.
- Milosevic, J., Pandit, K., Magister, M., Rabinovich, E., Ellwanger, D.C., Yu, G., Vuga, L.J., Weksler, B., Benos, P.V., Gibson, K.F., *et al.* (2012). Profibrotic role of miR-154 in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47, 879-887.
- Miyashita, T., and Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299.
- Moldoveanu, T., Liu, Q., Tocilj, A., Watson, M., Shore, G., and Gehring, K. (2006). The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site. *Mol Cell* 24, 677-688.
- Mondello, C., and Scovassi, A.I. (2004). Telomeres, telomerase, and apoptosis. *Biochem Cell Biol* 82, 498-507.
- Moodley, Y.P., Caterina, P., Scaffidi, A.K., Misso, N.L., Papadimitriou, J.M., McAnulty, R.J., Laurent, G.J., Thompson, P.J., and Knight, D.A. (2004). Comparison of the morphological and biochemical changes in normal human lung fibroblasts and fibroblasts derived from lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis during FasL-induced apoptosis. *J Pathol* 202, 486-495.
- Moore, B.B., and Hogaboam, C.M. (2008). Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, L152-160.
- Moran, C., Sanz-Rodriguez, A., Jimenez-Pacheco, A., Martinez-Villareal, J., McKiernan, R.C., Jimenez-Mateos, E.M., Mooney, C., Woods, I., Prehn, J.H., Henshall, D.C., *et al.* (2013). Bmf upregulation through the AMP-activated protein kinase pathway may protect the brain from seizure-induced cell death. *Cell Death Dis* 4, e606.
- Mori, C., Nakamura, N., Kimura, S., Irie, H., Takigawa, T., and Shiota, K. (1995). Programmed cell death in the interdigital tissue of the fetal mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation. *Anat Rec* 242, 103-110.
- Morrissey, E.E., and Hogan, B.L. (2010). Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. *Dev Cell* 18, 8-23.
- Motoyama, N., Wang, F., Roth, K.A., Sawa, H., Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S., *et al.* (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 267, 1506-1510.
- Motyl, T., Gajkowska, B., Zarzynska, J., Gajewska, M., and Lamparska-Przybysz, M. (2006). Apoptosis and autophagy in mammary gland remodeling and breast cancer chemotherapy. *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 7, 17-32.
- Moubarak, R.S., Yuste, V.J, Artus, C., Bouharrou, A., Greer, P.A., Menissier-de Murcia, J., Susin, S.A. (2007). Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Mol Cell Biol* 27, 4844-4862.

- Mouratis, M.A., and Aidinis, V. (2011). Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Curr Opin Pulm Med* 17, 355-361.
- Mucenski, M.L., Wert, S.E., Nation, J.M., Loudy, D.E., Huelsken, J., Birchmeier, W., Morrissey, E.E., and Whitsett, J.A. (2003). beta-Catenin is required for specification of proximal/distal cell fate during lung morphogenesis. *J Biol Chem* 278, 40231-40238.
- Murphy, A.N., Bredesen, D.E., Cortopassi, G., Wang, E., and Fiskum, G. (1996). Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9893-9898.
- Murphy, K.M., Heimberger, A.B., and Loh, D.Y. (1990). Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo. *Science* 250, 1720-1723.
- Mutsaers, S.E., Foster, M.L., Chambers, R.C., Laurent, G.J., and McAnulty, R.J. (1998). Increased endothelin-1 and its localization during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18, 611-619.
- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273, 2926-2930.
- Nachbur, U., Vince, J.E., O'Reilly, L.A., Strasser, A., and Silke, J. (2012). Is BID required for NOD signalling? *Nature* 488, E4-6; discussion E6-8.
- Nakajima, W., and Tanaka, N. (2007). Synergistic induction of apoptosis by p53-inducible Bcl-2 family proteins Noxa and Puma. *J Nippon Med Sch* 74, 148-157.
- Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7, 683-694.
- Nakashima, N., Kuwano, K., Maeyama, T., Hagimoto, N., Yoshimi, M., Hamada, N., Yamada, M., and Nakanishi, Y. (2005). The p53-Mdm2 association in epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis and non-specific interstitial pneumonia. *J Clin Pathol* 58, 583-589.
- Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1998). Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14681-14686.
- Nguyen, M., Millar, D.G., Yong, V.W., Korsmeyer, S.J., and Shore, G.C. (1993). Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem* 268, 25265-25268.
- Ni, M., and Lee, A.S. (2007). ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett* 581, 3641-3651.
- Nishita, M., Inoue, S., Tsuda, M., Tateda, C., and Miyashita, T. (1998). Nuclear translocation and increased expression of Bax and disturbance in cell cycle progression without prominent apoptosis induced by hyperthermia. *Exp Cell Res* 244, 357-366.

- Nogee, L.M., Dunbar, A.E., 3rd, Wert, S.E., Askin, F., Hamvas, A., and Whitsett, J.A. (2001). A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N Engl J Med* 344, 573-579.
- Nomura, M., Shimizu, S., Sugiyama, T., Narita, M., Ito, T., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (2003). 14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *J Biol Chem* 278, 2058-2065.
- Nutt, L.K., Pataer, A., Pahler, J., Fang, B., Roth, J., McConkey, D.J., and Swisher, S.G. (2002). Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca²⁺ stores. *J Biol Chem* 277, 9219-9225.
- O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L.A., Hausmann, G., Adams, J.M., Cory, S., and Huang, D.C. (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* 17, 384-395.
- O'Reilly, L.A., Huang, D.C., and Strasser, A. (1996). The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *EMBO J* 15, 6979-6990.
- Oberstein, A., Jeffrey, P.D., and Shi, Y. (2007). Crystal structure of the Bcl-XL-Bcl-1 peptide complex: Bcl-1 is a novel BH3-only protein. *J Biol Chem* 282, 13123-13132.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-1058.
- Odake, S., Kam, C.M., Narasimhan, L., Poe, M., Blake, J.T., Krahenbuhl, O., Tschopp, J., and Powers, J.C. (1991). Human and murine cytotoxic T lymphocyte serine proteases: subsite mapping with peptide thioester substrates and inhibition of enzyme activity and cytolysis by isocoumarins. *Biochemistry* 30, 2217-2227.
- Ohtsuka, T., Ryu, H., Minamishima, Y.A., Macip, S., Sagara, J., Nakayama, K.I., Aaronson, S.A., and Lee, S.W. (2004). ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nat Cell Biol* 6, 121-128.
- Olsen, K.C., Sapinoro, R.E., Kottmann, R.M., Kulkarni, A.A., Iismaa, S.E., Johnson, G.V., Thatcher, T.H., Phipps, R.P., and Sime, P.J. (2011). Transglutaminase 2 and its role in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 184, 699-707.
- Oltvai, Z.N., Millman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.
- Orlowsky, A., Berger, M.S., and Prystowsky, M.B. (1991). Novel expression pattern of a new member of the MIP-1 family of cytokine-like genes. *Cell Regul* 2, 403-412.
- Orlowsky, A., Weiss, L.M., Kawachi, N., and Prystowsky, M.B. (2002). Deficiency in the anti-apoptotic protein A1-a results in a diminished acute inflammatory response. *J Immunol* 168, 1840-1846.
- Ottina, E., Tischner, D., Herold, M.J., and Villunger, A. (2012). A1/Bfl-1 in leukocyte development and cell death. *Exp Cell Res* 318, 1291-1303.

- Padela, S., Cabacungan, J., Shek, S., Belcastro, R., Yi, M., Jankov, R.P., and Tanswell, A.K. (2005). Hepatocyte growth factor is required for alveologenesis in the neonatal rat. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 907-914.
- Pandit, K.V., Milosevic, J., and Kaminski, N. (2011). MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl Res* 157, 191-199.
- Pardali, K., Kurisaki, A., Moren, A., ten Dijke, P., Kardassis, D., and Moustakas, A. (2000). Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 275, 29244-29256.
- Patel, P., West-Mays, J., Kolb, M., Rodrigues, J.C., Hoff, C.M., and Margetts, P.J. (2010). Platelet derived growth factor B and epithelial mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells. *Matrix Biol* 29, 97-106.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927-939.
- Penault-Llorca, F., Bouabdallah, R., Devilard, E., Charton-Bain, M.C., Hassoun, J., Birg, F., and Xerri, L. (1998). Analysis of BAX expression in human tissues using the anti-BAX, 4F11 monoclonal antibody on paraffin sections. *Pathol Res Pract* 194, 457-464.
- Pepicelli, C.V., Lewis, P.M., and McMahon, A.P. (1998). Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr Biol* 8, 1083-1086.
- Peyerl, F.W., Dai, S., Murphy, G.A., Crawford, F., White, J., Marrack, P., and Kappler, J.W. (2007). Elucidation of some Bax conformational changes through crystallization of an antibody-peptide complex. *Cell Death Differ* 14, 447-452.
- Phin, S., Marchand-Adam, S., Fabre, A., Marchal-Somme, J., Bantsimba-Malanda, C., Kataoka, H., Soler, P., and Crestani, B. (2010). Imbalance in the pro-hepatocyte growth factor activation system in bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42, 286-293.
- Pinon, J.D., Labi, V., Egle, A., and Villunger, A. (2008). Bim and Bmf in tissue homeostasis and malignant disease. *Oncogene* 27 *Suppl 1*, S41-52.
- Plataki, M., Koutsopoulos, A.V., Darivianaki, K., Delides, G., Siafakas, N.M., and Bouros, D. (2005). Expression of apoptotic and antiapoptotic markers in epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 127, 266-274.
- Polakis, P. (2012). Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Poruchynsky, M.S., Wang, E.E., Rudin, C.M., Blagosklonny, M.V., and Fojo, T. (1998). Bcl-xL is phosphorylated in malignant cells following microtubule disruption. *Cancer Res* 58, 3331-3338.
- Print, C.G., Loveland, K.L., Gibson, L., Meehan, T., Stylianou, A., Wreford, N., de Kretser, D., Metcalf, D., Kontgen, F., Adams, J.M., *et al.* (1998). Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12424-12431.

- Pritchard, D.M., Print, C., O'Reilly, L., Adams, J.M., Potten, C.S., and Hickman, J.A. (2000). Bcl-w is an important determinant of damage-induced apoptosis in epithelia of small and large intestine. *Oncogene* 19, 3955-3959.
- Psathakis, K., Mermigkis, D., Papatheodorou, G., Loukides, S., Panagou, P., Polychronopoulos, V., Siafakas, N.M., and Bouros, D. (2006). Exhaled markers of oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur J Clin Invest* 36, 362-367.
- Pugach, B.V. (1975). [Age-related peculiarities of the effect of angiotensin-2 on some hemodynamic indices]. *Farmakol Toksikol* 38, 427-430.
- Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M., and Strasser, A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 3, 287-296.
- Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L.A., Beaumont, J.G., Coultas, L., Cheney, R.E., Huang, D.C., and Strasser, A. (2001). Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 293, 1829-1832.
- Raghu, G., Collard, H.R., Egan, J.J., Martinez, F.J., Behr, J., Brown, K.K., Colby, T.V., Cordier, J.F., Flaherty, K.R., Lasky, J.A., *et al.* (2011). An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 183, 788-824.
- Rahman, I., Biswas, S.K., and Kode, A. (2006). Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol* 533, 222-239.
- Ramjaun, A.R., Tomlinson, S., Eddaoudi, A., and Downward, J. (2007). Upregulation of two BH3-only proteins, Bmf and Bim, during TGF beta-induced apoptosis. *Oncogene* 26, 970-981.
- Ranger, A.M., Zha, J., Harada, H., Datta, S.R., Danial, N.N., Gilmore, A.P., Kutok, J.L., Le Beau, M.M., Greenberg, M.E., and Korsmeyer, S.J. (2003). Bad-deficient mice develop diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9324-9329.
- Rao, L., Perez, D., and White, E. (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 135, 1441-1455.
- Reginato, M.J., Mills, K.R., Paulus, J.K., Lynch, D.K., Sgroi, D.C., Debnath, J., Muthuswamy, S.K., and Brugge, J.S. (2003). Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol* 5, 733-740.
- Ren, D., Tu, H.C., Kim, H., Wang, G.X., Bean, G.R., Takeuchi, O., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J., and Cheng, E.H. (2010). BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science* 330, 1390-1393.
- Renault, T.T., and Manon, S. (2011). Bax: Addressed to kill. *Biochimie* 93, 1379-1391.

- Rinkenberger, J.L., Horning, S., Klocke, B., Roth, K., and Korsmeyer, S.J. (2000). Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev* 14, 23-27.
- Roach, H.I., and Clarke, N.M. (2000). Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. *J Bone Joint Surg Br* 82, 601-613.
- Robert, G., Gastaldi, C., Puissant, A., Hamouda, A., Jacquelin, A., Dufies, M., Belhacene, N., Colosetti, P., Reed, J.C., Auburger, P., *et al.* (2012). The anti-apoptotic Bcl-2 protein inhibits BECN1-dependent autophagic cell death. *Autophagy* 8, 637-649.
- Rodriguez, H.M., Vaysberg, M., Mikels, A., McCauley, S., Velayo, A.C., Garcia, C., and Smith, V. (2010). Modulation of lysyl oxidase-like 2 enzymatic activity by an allosteric antibody inhibitor. *J Biol Chem* 285, 20964-20974.
- Ross, R., Raines, E.W., and Bowen-Pope, D.F. (1986). The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46, 155-169.
- Roy, S., Khanna, S., Rink, T., Radtke, J., Williams, W.T., Biswas, S., Schnitt, R., Strauch, A.R., and Sen, C.K. (2007). P21waf1/cip1/sdi1 as a central regulator of inducible smooth muscle actin expression and differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Mol Biol Cell* 18, 4837-4846.
- Salah-eldin, A., Inoue, S., Tsuda, M., and Matsuura, A. (2000). Abnormal intracellular localization of Bax with a normal membrane anchor domain in human lung cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res* 91, 1269-1277.
- Salvesen, G.S., and Duckett, C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 401-410.
- Sarosiek, K.A., Chi, X., Bachman, J.A., Sims, J.J., Montero, J., Patel, L., Flanagan, A., Andrews, D.W., Sorger, P., and Letai, A. (2013). BID preferentially activates BAK while BIM preferentially activates BAX, affecting chemotherapy response. *Mol Cell* 51, 751-765.
- Sato, T., Hanada, M., Bodrug, S., Irie, S., Iwama, N., Boise, L.H., Thompson, C.B., Golemis, E., Fong, L., Wang, H.G., *et al.* (1994). Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9238-9242.
- Schafer, Z.T., and Kornbluth, S. (2006). The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Dev Cell* 10, 549-561.
- Schellenberg, B., Wang, P., Keeble, J.A., Rodriguez-Enriquez, R., Walker, S., Owens, T.W., Foster, F., Tanianis-Hughes, J., Brennan, K., Streuli, C.H., *et al.* Bax exists in a dynamic equilibrium between the cytosol and mitochondria to control apoptotic priming. *Mol Cell* 49, 959-971.
- Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M., Dever-Bertrand, J., and Bertrand, R. (2000). Characterization of Bax-sigma, a cell death-inducing isoform of Bax. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 868-879.

Schroder, M. (2008). Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci* 65, 862-894.

Schulze-Osthoff, K., Bakker, A.C., Vanhaesebroeck, B., Beyaert, R., Jacob, W.A., and Fiers, W. (1992). Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem* 267, 5317-5323.

Schweers, R.L., Zhang, J., Randall, M.S., Loyd, M.R., Li, W., Dorsey, F.C., Kundu, M., Opferman, J.T., Cleveland, J.L., Miller, J.L., *et al.* (2007). NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19500-19505.

Sebbagh, M., Hamelin, J., Bertoglio, J., Solary, E., and Breard, J. (2005). Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *J Exp Med* 201, 465-471.

Sebbagh, M., Renvoize, C., Hamelin, J., Riche, N., Bertoglio, J., and Breard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 3, 346-352.

Selman, M., and Pardo, A. (2006). Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc* 3, 364-372.

Sessler, T., Healy, S., Samali, A., and Szegezdi, E. (2013). Structural determinants of DISC function: New insights into death receptor-mediated apoptosis signalling. *Pharmacol Ther* 140, 186-199.

Shi, B., Triebe, D., Kajiji, S., Iwata, K.K., Bruskin, A., and Mahajna, J. (1999). Identification and characterization of baxepsilon, a novel bax variant missing the BH2 and the transmembrane domains. *Biochem Biophys Res Commun* 254, 779-785.

Shiozaki, E.N., Chai, J., and Shi, Y. (2002). Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4197-4202.

Shore, G.C. (2009). Apoptosis: it's BAK to VDAC. *EMBO Rep* 10, 1311-1313.

Silke, J., Kratina, T., Chu, D., Ekert, P.G., Day, C.L., Pakusch, M., Huang, D.C., and Vaux, D.L. (2005). Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16182-16187.

Simmons, M.J., Fan, G., Zong, W.X., Degenhardt, K., White, E., and Gelinas, C. (2008). Bfl-1/A1 functions, similar to Mcl-1, as a selective tBid and Bak antagonist. *Oncogene* 27, 1421-1428.

Sisson, T.H., Maher, T.M., Ajayi, I.O., King, J.E., Higgins, P.D., Booth, A.J., Sagana, R.L., Huang, S.K., White, E.S., Moore, B.B., *et al.* (2012). Increased survivin expression contributes to apoptosis-resistance in IPF fibroblasts. *Adv Biosci Biotechnol* 3, 657-664.

Smith, M.A., and Schnellmann, R.G. (2012). Calpains, mitochondria, and apoptosis. *Cardiovasc Res* 96, 32-37.

- Somogyi, R.D., Wu, Y., Orlofsky, A., and Prystowsky, M.B. (2001). Transient expression of the Bcl-2 family member, A1-a, results in nuclear localization and resistance to staurosporine-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 8, 785-793.
- Song, Q., Kuang, Y., Dixit, V.M., and Vincenz, C. (1999). Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *EMBO J* 18, 167-178.
- Sorokin, A.V., Kim, E.R., and Ovchinnikov, L.P. (2007). Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Mosc)* 72, 1439-1457.
- Soussi, T., and Beroud, C. (2001). Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 1, 233-240.
- Spender, L.C., O'Brien, D.I., Simpson, D., Dutt, D., Gregory, C.D., Allday, M.J., Clark, L.J., and Inman, G.J. (2009). TGF-beta induces apoptosis in human B cells by transcriptional regulation of BIK and BCL-XL. *Cell Death Differ* 16, 593-602.
- Srinivasula, S.M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R.A., Robbins, P.D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., *et al.* (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410, 112-116.
- Stewart, G.A., Hoyne, G.F., Ahmad, S.A., Jarman, E., Wallace, W.A., Harrison, D.J., Haslett, C., Lamb, J.R., and Howie, S.E. (2003). Expression of the developmental Sonic hedgehog (Shh) signalling pathway is up-regulated in chronic lung fibrosis and the Shh receptor patched 1 is present in circulating T lymphocytes. *J Pathol* 199, 488-495.
- Strasser, A., Cory, S., and Adams, J.M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J* 30, 3667-3683.
- Street, C.A., and Bryan, B.A. (2011). Rho kinase proteins--pleiotropic modulators of cell survival and apoptosis. *Anticancer Res* 31, 3645-3657.
- Sugahara, K., Iyama, K., Kuroda, M.J., and Sano, K. (1998). Double intratracheal instillation of keratinocyte growth factor prevents bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *J Pathol* 186, 90-98.
- Suzuki, M., Youle, R.J., and Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, 645-654.
- Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., and Takahashi, R. (2001). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8662-8667.
- Swigris, J.J., and Brown, K.K. (2010). The role of endothelin-1 in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *BioDrugs* 24, 49-54.
- Tao, W., Kurschner, C., and Morgan, J.I. (1997). Modulation of cell death in yeast by the Bcl-2 family of proteins. *J Biol Chem* 272, 15547-15552.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 231-241.

Terrones, O., Antonsson, B., Yamaguchi, H., Wang, H.G., Liu, J., Lee, R.M., Herrmann, A., and Basanez, G. (2004). Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID. *J Biol Chem* 279, 30081-30091.

Thomas, A.Q., Lane, K., Phillips, J., 3rd, Prince, M., Markin, C., Speer, M., Schwartz, D.A., Gaddipati, R., Marney, A., Johnson, J., *et al.* (2002). Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 1322-1328.

Thomas, D.A., Du, C., Xu, M., Wang, X., and Ley, T.J. (2000). DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity* 12, 621-632.

Thomas, L.W., Lam, C., and Edwards, S.W. (2010). Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett* 584, 2981-2989.

Thomas, P.E., Peters-Golden, M., White, E.S., Thannickal, V.J., and Moore, B.B. (2007). PGE(2) inhibition of TGF-beta1-induced myofibroblast differentiation is Smad-independent but involves cell shape and adhesion-dependent signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293, L417-428.

Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., *et al.* (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768-774.

Tianhu, Z., Shiguang, Z., and Xinghan, L. (2010). Bmf is upregulated by PS-341-mediated cell death of glioma cells through JNK phosphorylation. *Mol Biol Rep* 37, 1211-1219.

Tomita, Y., Marchenko, N., Erster, S., Nemajerova, A., Dehner, A., Klein, C., Pan, H., Kessler, H., Pancoska, P., and Moll, U.M. (2006). WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem* 281, 8600-8606.

Toyota, H., Yanase, N., Yoshimoto, T., Moriyama, M., Sudo, T., and Mizuguchi, J. (2003). Calpain-induced Bax-cleavage product is a more potent inducer of apoptotic cell death than wild-type Bax. *Cancer Lett* 189, 221-230.

Tripathi, S., Batra, J., Cao, W., Sharma, K., Patel, J.R., Ranjan, P., Kumar, A., Katz, J.M., Cox, N.J., Lal, R.B., *et al.* Influenza A virus nucleoprotein induces apoptosis in human airway epithelial cells: implications of a novel interaction between nucleoprotein and host protein Clusterin. *Cell Death Dis* 4, e562.

Trisciuglio, D., Gabellini, C., Desideri, M., Ziparo, E., Zupi, G., and Del Bufalo, D. Bcl-2 regulates HIF-1alpha protein stabilization in hypoxic melanoma cells via the molecular chaperone HSP90. *PLoS One* 5, e11772.

Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., and Croce, C.M. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226, 1097-1099.

Tucker, A.S. (2007). Salivary gland development. *Semin Cell Dev Biol* 18, 237-244.

- Uhal, B.D., Joshi, I., Hughes, W.F., Ramos, C., Pardo, A., and Selman, M. (1998). Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am J Physiol* 275, L1192-1199.
- Uren, A.G., Coulson, E.J., and Vaux, D.L. (1998). Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts. *Trends Biochem Sci* 23, 159-162.
- Vairo, G., Soos, T.J., Upton, T.M., Zalvide, J., DeCaprio, J.A., Ewen, M.E., Koff, A., and Adams, J.M. (2000). Bcl-2 retards cell cycle entry through p27(Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Mol Cell Biol* 20, 4745-4753.
- Valdes, A.M., Andrew, T., Gardner, J.P., Kimura, M., Oelsner, E., Cherkas, L.F., Aviv, A., and Spector, T.D. (2005). Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* 366, 662-664.
- van den Berg, B.H., and Tholey, A. (2012). Mass spectrometry-based proteomics strategies for protease cleavage site identification. *Proteomics* 12, 516-529.
- van Loo, G., Schotte, P., van Gurp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., Rodriguez, I., Ruiz-Carrillo, A., Vandekerckhove, J., Declercq, W., *et al.* (2001). Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* 8, 1136-1142.
- Vandenabeele, P., Declercq, W., Van Herreweghe, F., and Vanden Berghe, T. (2010). The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci Signal* 3, re4.
- Vaux, D.L., Cory, S., and Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-442.
- Veis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75, 229-240.
- Venero, J.L., Burguillos, M.A., and Joseph, B. (2013). Caspases playing in the field of neuroinflammation: old and new players. *Dev Neurosci* 35, 88-101.
- Verhagen, A.M., Silke, J., Ekert, P.G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L.M., Day, C.L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., *et al.* (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 277, 445-454.
- Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Mullauer, F., Bock, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M., and Strasser, A. (2003). p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 302, 1036-1038.
- Vindis, C., Elbaz, M., Escargueil-Blanc, I., Auge, N., Heniquez, A., Thiers, J.C., Negre-Salvayre, A., and Salvayre, R. (2005). Two distinct calcium-dependent mitochondrial pathways are involved in oxidized LDL-induced apoptosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 639-645.

- Visscher, D.W., and Myers, J.L. (2006). Histologic spectrum of idiopathic interstitial pneumonias. *Proc Am Thorac Soc* 3, 322-329.
- Vittal, R., Zhang, H., Han, M.K., Moore, B.B., Horowitz, J.C., and Thannickal, V.J. (2007). Effects of the protein kinase inhibitor, imatinib mesylate, on epithelial/mesenchymal phenotypes: implications for treatment of fibrotic diseases. *J Pharmacol Exp Ther* 321, 35-44.
- Vogel, S., Raulf, N., Bregenhorn, S., Biniossek, M.L., Maurer, U., Czabotar, P., and Borner, C. (2012). Cytosolic Bax: does it require binding proteins to keep its pro-apoptotic activity in check? *J Biol Chem* 287, 9112-9127.
- Vuga, L.J., Ben-Yehudah, A., Kovkarova-Naumovski, E., Oriss, T., Gibson, K.F., Feghali-Bostwick, C., and Kaminski, N. (2009). WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41, 583-589.
- Waghray, M., Cui, Z., Horowitz, J.C., Subramanian, I.M., Martinez, F.J., Toews, G.B., and Thannickal, V.J. (2005). Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. *FASEB J* 19, 854-856.
- Waisberg, D.R., Barbas-Filho, J.V., Parra, E.R., Fernezlian, S., de Carvalho, C.R., Kairalla, R.A., and Capelozzi, V.L. (2010). Abnormal expression of telomerase/apoptosis limits type II alveolar epithelial cell replication in the early remodeling of usual interstitial pneumonia/idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Pathol* 41, 385-391.
- Wallach-Dayana, S.B., Izbicki, G., Cohen, P.Y., Gerstl-Golan, R., Fine, A., and Breuer, R. (2006). Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L790-L796.
- Walsh, D.W., Godson, C., Brazil, D.P., and Martin, F. (2010). Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots. *Trends Cell Biol* 20, 244-256.
- Wang, K., Gross, A., Waksman, G., and Korsmeyer, S.J. (1998). Mutagenesis of the BH3 domain of BAX identifies residues critical for dimerization and killing. *Mol Cell Biol* 18, 6083-6089.
- Wang, K., Yin, X.M., Chao, D.T., Millman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1996). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* 10, 2859-2869.
- Wang, Y., Kuan, P.J., Xing, C., Cronkhite, J.T., Torres, F., Rosenblatt, R.L., DiMaio, J.M., Kinch, L.N., Grishin, N.V., and Garcia, C.K. (2009). Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *Am J Hum Genet* 84, 52-59.
- Ware, L.B., and Matthay, M.A. (2002). Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282, L924-940.
- Weaver, M., Batts, L., and Hogan, B.L. (2003). Tissue interactions pattern the mesenchyme of the embryonic mouse lung. *Dev Biol* 258, 169-184.

Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-730.

Wei, Y., Sinha, S., and Levine, B. (2008). Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy* 4, 949-951.

Weinlich, R., Dillon, C.P., and Green, D.R. (2011). Ripped to death. *Trends Cell Biol* 21, 630-637.

Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P.E., and Kluck, R.M. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta* 1813, 521-531.

Wilborn, J., Crofford, L.J., Burdick, M.D., Kunkel, S.L., Strieter, R.M., and Peters-Golden, M. (1995). Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E2 and to express cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 95, 1861-1868.

Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., *et al.* (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315, 856-859.

Wilson-Annan, J., O'Reilly, L.A., Crawford, S.A., Hausmann, G., Beaumont, J.G., Parma, L.P., Chen, L., Lackmann, M., Lithgow, T., Hinds, M.G., *et al.* (2003). Proapoptotic BH3-only proteins trigger membrane integration of prosurvival Bcl-w and neutralize its activity. *J Cell Biol* 162, 877-887.

Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., and Youle, R.J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 139, 1281-1292.

Wynes, M.W., Edelman, B.L., Kostyk, A.G., Edwards, M.G., Coldren, C., Groshong, S.D., Cosgrove, G.P., Redente, E.F., Bamberg, A., Brown, K.K., *et al.* (2011). Increased cell surface Fas expression is necessary and sufficient to sensitize lung fibroblasts to Fas ligation-induced apoptosis: implications for fibroblast accumulation in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol* 187, 527-537.

Xiao, D., Choi, S., Johnson, D.E., Vogel, V.G., Johnson, C.S., Trump, D.L., Lee, Y.J., and Singh, S.V. (2004). Diallyl trisulfide-induced apoptosis in human prostate cancer cells involves c-Jun N-terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase-mediated phosphorylation of Bcl-2. *Oncogene* 23, 5594-5606.

Yakovlev, A.G., Di Giovanni, S., Wang, G., Liu, W., Stoica, B., and Faden, A.I. (2004). BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem* 279, 28367-28374.

Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (1995a). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80, 285-291.

- Yang, J., Sun, M., Zhang, A., Lv, C., De, W., and Wang, Z. Adenovirus-mediated siRNA targeting Bcl-xL inhibits proliferation, reduces invasion and enhances radiosensitivity of human colorectal cancer cells. *World J Surg Oncol* 9, 117.
- Yang, T., Kozopas, K.M., and Craig, R.W. (1995b). The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J Cell Biol* 128, 1173-1184.
- Yeretssian, G., Correa, R.G., Doiron, K., Fitzgerald, P., Dillon, C.P., Green, D.R., Reed, J.C., and Saleh, M. (2011). Non-apoptotic role of BID in inflammation and innate immunity. *Nature* 474, 96-99.
- Yin, X.M. (2006). Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene* 369, 7-19.
- Yin, X.M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A., and Korsmeyer, S.J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400, 886-891.
- Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 7, 673-682.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-652.
- Yuan, S., Topf, M., Reubold, T.F., Eschenburg, S., and Akey, C.W. (2013). Changes in Apaf-1 conformation that drive apoptosome assembly. *Biochemistry* 52, 2319-2327.
- Zeisberg, E.M., Tarnavski, O., Zeisberg, M., Dorfman, A.L., McMullen, J.R., Gustafsson, E., Chandraker, A., Yuan, X., Pu, W.T., Roberts, A.B., *et al.* (2007). Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 13, 952-961.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87, 619-628.
- Zha, J., Weiler, S., Oh, K.J., Wei, M.C., and Korsmeyer, S.J. (2000). Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* 290, 1761-1765.
- Zhai, D., Ke, N., Zhang, H., Lador, U., Joseph, M., Eichinger, A., Godzik, A., Ng, S.C., and Reed, J.C. (2003). Characterization of the anti-apoptotic mechanism of Bcl-B. *Biochem J* 376, 229-236.
- Zhang, G. (2004). Tumor necrosis factor family ligand-receptor binding. *Curr Opin Struct Biol* 14, 154-160.

- Zhang, H., Cowan-Jacob, S.W., Simonen, M., Greenhalf, W., Heim, J., and Meyhack, B. (2000). Structural basis of BFL-1 for its interaction with BAX and its anti-apoptotic action in mammalian and yeast cells. *J Biol Chem* 275, 11092-11099.
- Zhang, H., Holzgreve, W., and De Geyter, C. (2001). Bcl2-L-10, a novel anti-apoptotic member of the Bcl-2 family, blocks apoptosis in the mitochondria death pathway but not in the death receptor pathway. *Hum Mol Genet* 10, 2329-2339.
- Zhang, H.Y., Gharaee-Kermani, M., and Phan, S.H. (1997). Regulation of lung fibroblast alpha-smooth muscle actin expression, contractile phenotype, and apoptosis by IL-1beta. *J Immunol* 158, 1392-1399.
- Zhang, H.Y., and Phan, S.H. (1999). Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta(1). *Am J Respir Cell Mol Biol* 21, 658-665.
- Zhang, K., and Kaufman, R.J. (2006). The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology* 66, S102-109.
- Zhang, K., Rekhter, M.D., Gordon, D., and Phan, S.H. (1994). Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* 145, 114-125.
- Zhou, M., Demo, S.D., McClure, T.N., Crea, R., and Bitler, C.M. (1998). A novel splice variant of the cell death-promoting protein BAX. *J Biol Chem* 273, 11930-11936.
- Zhu, L., Yu, Y., Chua, B.H., Ho, Y.S., and Kuo, T.H. (2001). Regulation of sodium-calcium exchange and mitochondrial energetics by Bcl-2 in the heart of transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 33, 2135-2144.
- Zong, W.X., Edelstein, L.C., Chen, C., Bash, J., and Gelinas, C. (1999). The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev* 13, 382-387.
- Zong, W.X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q.C., Yuan, J., and Thompson, C.B. (2003). Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol* 162, 59-69.
- Zou, H., Volonte, D., and Galbiati, F. (2012). Interaction of caveolin-1 with Ku70 inhibits Bax-mediated apoptosis. *PLoS One* 7, e39379.